

**Der Beitrag des Nicht-Homologen End-Joining (NHEJ)
bzw. der Homologen Rekombination (HR) zur Reparatur
von strahleninduzierten DNA-Doppelstrangbrüchen
(DSBs)**

**Vom Fachbereich Biologie der Technischen Universität Darmstadt zur Erlangung des
akademischen Grades eines Doctor rerum naturalium**

(Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation von

Diplom-Biologin Leopoldine Njoke A Biaka

Geboren in Douala (Kamerun)

Darmstadt 2010

D17

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Markus Löbrich
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Gerhard Thiel

Tag der Einreichung: 8 Oktober 2010

Tag der mündlichen Prüfung: 17 Dezember 2010

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biophysik der Universität des Saarlandes, Abteilung Theoretische Medizin und am Institut für Zoologie, Abteilung Strahlenbiologie und DNA-Reparatur der Technischen Universität Darmstadt in der Zeit von Juni 2004 bis Juli 2008 unter der Leitung von Prof. Dr. Markus Löbrich angefertigt. Diese Arbeit wurde teilweise durch das Graduiertenkolleg „Zelluläre Regulation und Wachstum“ der Universität des Saarlandes unterstützt.

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| Inhaltsverzeichnis..... | I |
| Abkürzungen | A |
| 1. Zusammenfassung/Summary | 1 |
| 2. Einleitung | 5 |
| 2.1. Physikalische und biologische Grundlagen der Strahlenforschung | 5 |
| 2.1.1. Physikalische Grundlagen..... | 5 |
| 2.1.2. Biologische Grundlagen..... | 7 |
| 2.2. Zelluläre Schadensantwort auf DNA-Doppelstrangbrüche | 9 |
| 2.2.1. Erkennung von DNA-Doppelstrangbrüchen..... | 11 |
| 2.2.2. Die Regulation des Zellzyklus im Zusammenhang mit Checkpoint-Proteinen..... | 13 |
| 2.3. Reparaturwege von DNA-Doppelstrangbrüchen | 17 |
| 2.3.1. Das Nicht Homologe End-Joining (NHEJ)..... | 17 |
| 2.3.2. Die Homologe Rekombination (HR) | 18 |
| 2.3.3. Das Single Strand Annealing (SSR) | 22 |
| 2.4. Klinische und zelluläre Auswirkungen von Defekten der DNA-Schadenserkennung und -Reparatur..... | 23 |
| 2.4.1. Ataxia-telangiectasia (AT) und ATM | 23 |
| 2.4.2. Severe Combined Immunodeficiency (SCID) und DNA-PKcs..... | 24 |
| 2.4.3. Ligase4-Syndrom | 24 |
| 2.4.4. <u>X</u> RCC4 <u>L</u> ike <u>F</u> actor (XLF)/Cernunnos | 25 |
| 2.4.5. Radiation Sensitive Severe Combined Immunodeficiency (RD SCID) und Artemis | 25 |
| 2.4.6. Hereditäres Mammakarzinom (BRCA1/BRCA2) | 25 |
| 2.5. Nachweis von DNA-Doppelstrangbrüchen | 26 |
| 2.5.1. Immunfluoreszenzmikroskopie..... | 26 |
| 2.6. Ziel der Arbeit..... | 28 |
| 2.6.1. Welchen Anteil übernehmen ATM und Artemis zur Reparatur von DNA-DSBs in der G1- und der G2-Phase?..... | 28 |
| 2.6.2. Welchen Anteil haben das NHEJ und die HR zur Reparatur von DNA-DSBs in der G2-Phase des Zellzyklus? | 29 |
| 3. Material und Methoden | 30 |
| 3.1. Material | 30 |
| 3.1.1. Geräte und Verbrauchsmaterial | 30 |
| 3.1.2. Medien, Puffer und Chemikalien | 31 |

| | |
|---|-----------|
| 3.1.3. Eingesetzte Lösungen | 32 |
| 3.1.4. Antikörper | 32 |
| 3.1.4.1. Primäre Antikörper | 32 |
| 3.1.4.2. Sekundäre Antikörper | 32 |
| 3.1.5. Oligonukleotide | 33 |
| 3.1.6. Verwendete Zelllinien | 34 |
| 3.1.6.1. Primäre Zelllinien | 34 |
| 3.1.6.2. Immortalisierte Zelllinien | 35 |
| 3.1.6.3. Murine embryonale Fibroblasten (MEFs) | 36 |
| 3.1.6.4. HeLa | 37 |
| 3.2. Methoden | 37 |
| 3.2.1. Kultivierung von Zellen | 37 |
| 3.2.1.1. Behandlung der Zellen mit Inhibitoren | 38 |
| 3.2.1.2. Zählen von Zellen | 38 |
| 3.2.1.3. Einfrieren von Zellen | 38 |
| 3.2.1.4. Auftauen und Expansion von Zellen | 38 |
| 3.2.2. Röntgenbestrahlung | 38 |
| 3.2.3. siRNA (<i>small interference RNA</i>)-Analyse | 39 |
| 3.2.4. Immunfluoreszenzstudien | 40 |
| 3.2.4.1. Markierung der Zellen mit BrdU | 40 |
| 3.2.4.2. Fixierung und Permeabilisierung der Zellen | 40 |
| 3.2.4.2.1. Mit Methanol/Aceton | 40 |
| 3.2.4.2.2. Mit Formaldehyd/Triton | 40 |
| 3.2.4.3. Immunfluoreszenzfärbung von Zellen | 40 |
| 3.2.4.3.1. CENP-F/ γ H2AX-Doppelfärbung | 40 |
| 3.2.4.3.2. BrdU/CENP-F/ γ H2AX-Dreifachfärbung | 41 |
| 3.2.4.3.3. phosphoATM/CENP-F-Doppelfärbung | 41 |
| 3.2.4.3.4. phosphoATM/ γ H2AX-Doppelfärbung | 41 |
| 3.2.4.3.5. PhosphoH3/ γ H2AX-Doppelfärbung | 41 |
| 3.2.5. Auswertung der γ H2AX- und ATM-Foci | 42 |
| 3.2.6. Durchflußzytometrie | 42 |
| 4. Ergebnisse | 44 |
| 4.1. Identifizierung von Zellzyklusphasen in einer asynchron wachsenden Zellpopulation | 45 |

| | |
|---|-----------|
| 4.1.1. Anwendung von CENP-F als Zellzyklusmarker-Protein..... | 45 |
| 4.1.2. Nachweis von phosphoH3 als Zellzyklusmarker..... | 47 |
| 4.2. Untersuchung des Einflusses von Aphidicolin auf den Zellzyklus und auf die Reparatur strahleninduzierter DSBs..... | 49 |
| 4.2.1. Zellzyklusverteilung von menschlichen und murinen Fibroblasten in An- und Abwesenheit von Aphidicolin nach Bestrahlung mit 1 Gy IR | 49 |
| 4.2.2. Einfluss von Aphidicolin auf die Reparatur von DNA-DSBs | 52 |
| 4.2.3. Phosphoryliertes ATM als Marker für strahleninduzierte DSBs | 56 |
| 4.3. DSB-Reparatur von ATM- und Artemis-defizienten Zelllinien..... | 59 |
| 4.3.1. DSB-Reparatur von ATM- und Artemis-defizienten primären menschlichen Fibroblasten..... | 60 |
| 4.3.2. DSB-Reparatur von ATM- und Artemis-depletierten HeLa-Zellen | 62 |
| 4.3.3. DSB-Reparatur von MDC-1-, 53BP1-, ATM- und Artemis-defizienten MEFs..... | 64 |
| 4.3.4. DSB-Reparatur von 53BP1- und MDC-1-defizienten Zelllinien nach Behandlung mit einem spezifischen ATM-Inhibitor | 68 |
| 4.3.5. Zuordnung von ATM in der G2-Phase | 70 |
| 4.3.5.1. Vergleich der DSB-Reparatur von ATM- und HR-defizienten Zellen | 71 |
| 4.3.5.2. Epistasisanalysen mit dem ATM-Inhibitor bei HR-Mutanten | 72 |
| 4.4. Der Anteil von NHEJ und HR an der Reparatur von strahleninduzierten DSBs. 74 | |
| 4.4.1. DSB-Reparatur von XLF- und Ligase4-defizienten primären menschlichen Fibroblasten..... | 75 |
| 4.4.2. DSB-Reparatur in HeLa-Zellen nach Herunterregulation von Ligase4 | 78 |
| 4.4.3. DSB-Reparatur in Ku80-, DNA-PKcs- und Ligase4-defizienten murinen embryonalen Fibroblasten (MEFs). | 80 |
| 4.4.4. Vergleich der NHEJ- und HR-Reparaturgeschwindigkeiten..... | 82 |
| 4.5. DSB-Reparatur von HR/NHEJ-defizienten Zellen | 83 |
| 4.5.1. DSB-Reparatur von Rad51/Ku80-depletierten Zellen..... | 83 |
| 4.5.2. DSB-Reparatur von Rad54/Ligase4-defizienten Zellen | 85 |
| 4.5.3. Epistasisanalysen mit dem DNA-PKcs-Inhibitor (DNA-PKi) bei Rad54-defizienten MEFs..... | 87 |
| 4.5.4 Epistasisanalysen mit dem ATM- und DNA-PKcs-Inhibitor bei NHEJ-Mutanten. 89 | |
| 4.5.4.1. DSB-Reparaturverhalten von XLF-defizienten primären menschlichen Fibroblasten nach ATM- und DNA-PKcs-Inhibition | 90 |
| 4.5.4.2. DSB-Reparaturverhalten von Ligase4-defizienten MEFs nach ATM- und DNA-PKcs-Inhibition | 92 |
| 5. Diskussion | 95 |

| | |
|--|------------|
| 5.1. Vor- und Nachteile der γH2AX-Foci als Marker von DSBs..... | 96 |
| 5.2. Analyse der Reparaturreffizienz der unterschiedlichen WT-Zelllinien | 98 |
| 5.3. DSB-Reparatur: NHEJ versus HR | 99 |
| 5.3.1. Der Anteil von NHEJ und HR an der Reparatur von strahleninduzierten DSBs.... | 99 |
| 5.3.2. Vergleich des Ausmaßes der Reparaturdefekte unterschiedlicher NHEJ- und HR-Mutanten | 102 |
| 5.3.2.1. Vergleich des Ausmaßes der Reparaturdefekte von Ku80-, DNA-PKcs- und Ligase4-defizienten MEFs | 102 |
| 5.3.2.2. Vergleich des Ausmaßes der Reparaturdefekte von XRCC2- und Rad54-defizienten MEFs | 104 |
| 5.3.3. Analyse des unterschiedlichen Reparaturverhaltens in NHEJ/HR-defizienten Zellen | 106 |
| 5.3.4. Sind außer NHEJ und HR andere Reparaturmechanismen an der DSB-Reparatur beteiligt?..... | 108 |
| 5.3.5. Die Selektion des DSB-Reparaturwegs | 110 |
| 5.3.6. Ausblick | 114 |
| 5.4. Die Rolle von ATM und Artemis in dem NHEJ und der HR..... | 115 |
| 5.5. Die Rolle von MDC-1 und 53BP1 in der DSB-Reparatur | 122 |
| 5.5.1. Ausblick | 124 |
| 6. Literaturverzeichnis..... | 125 |
| 7. Anhang | 154 |
| 7.1. Lebenslauf | 154 |
| 7.2. Publikationen und Tagungsbeiträge..... | 155 |
| 7.3. Danksagung..... | 156 |
| 7.4. Eidesstattliche Erklärung | 157 |

Abkürzungen

| | |
|--------|---|
| AT | <i>Ataxia Telangiectasia</i> |
| ATCC | <i>American Type Culture Collection</i> |
| ATM | <i>Ataxia Telangiectasia Mutated</i> |
| BRCA2 | <i>Breast Cancer 2, Early Onset</i> |
| BSA | <i>Bovine Serum Albumin</i> |
| DAPI | 4', 6-Diamidino-2-Phenylindoldi-hydrochlorid |
| DMEM | <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA-PK | DNA-abhängige Proteinkinase |
| DSB | Doppelstrangbruch |
| ECACC | <i>European Collection of Animal Cell Culture</i> |
| FCS | <i>Fetal Calf Serum</i> (Fötales Kälberserum) |
| hTert | <i>human telomerase reverse transcriptase</i> |
| HR | Homologe Rekombination |
| IR | <i>Ionising Radiation</i> |
| NBS | Nijmegen Breakage-Syndrom |
| 53BP1 | <i>p53 binding protein 1</i> |
| LET | Linearer Energie Transfer |
| MEM | <i>Minimum Essential Medium</i> |
| MDC-1 | <i>Mediator of the Mammalian DNA Damage Checkpoint Protein1</i> |
| NEAA | <i>Non Essential Amino Acids</i> |
| NER | Nukleotidexzisionsreparatur |

| | |
|-------|---|
| NHEJ | <i>Non-Homologous-Endjoining</i> |
| siRNA | <i>Small Interference RNA</i> |
| PBS | <i>Phosphate Buffered Saline</i> |
| PIKK | Phosphatidyl-Inositol (PI) 3- Kinase ähnliche Kinase |
| RBW | Relative biologische Wirksamkeit |
| ROS | <i>Reactive Oxygen Species</i> |
| RPA | <i>Replication Protein A</i> |
| RT | Raumtemperatur |
| SCID | <i>Severe Combined Immune- Deficiency</i> |
| SSA | <i>Single Strand Annealing</i> |
| V(D)J | <i>Variable (Diversity) Joining</i> |
| XRCC | <i>X-Ray-Cross-Complementing</i> |
| w/v | <i>Weight per Volume</i> |

1. Zusammenfassung/Summary

In dieser Arbeit wurde die DSB-Reparatur von Wildtyp-Zellen und Zellen, die Defizienzen für bestimmte Reparaturproteine aufweisen, in der G1- und G2-Phase analysiert. Dafür wurde die γ H2AX-Immunfluoreszenzmikroskopie verwendet, die erlaubt DSBs nach geringen Dosen ionisierender Strahlung sichtbar zu machen. Diese γ H2AX-Analyse, kombiniert mit Zellzyklusmarker hat ermöglicht, das Reparaturverhalten in zwei verschiedenen Zellzyklusphasen innerhalb der Zellpopulation zu studieren und zu vergleichen. Der erste Teil dieser Arbeit beschäftigte sich mit der DSB-Reparaturanalyse von ATM-, Artemis-, MDC-1- und 53BP1-defizienten Zellen. Beide Proteine ATM und Artemis wurden als Faktoren des NHEJ-Reparaturwegs beschrieben, da sie in konfluenten Zellen (G0-Zellen) einen kleinen und identischen Reparaturweg aufweisen. Sie werden nur bei 10–15 % aller durch ionisierende Strahlung erzeugten DSBs benötigt (Riballo et al., 2004). Es stellte sich nun die Frage, inwieweit der ATM- und Artemis-abhängige Reparaturweg eine Rolle in aktiv proliferierenden Zellen spielt. ATM und Artemis zeigen in der G1- und G2-Phase einen kleinen und ähnlichen Reparaturdefekt. Etwa 15 % der DSBs bleiben im Vergleich zu WT-Zellen unrepariert. Die doppelte Depletion von ATM und Artemis in HeLa-Zellen mittels siRNA bewirkt, sowohl in der G1- als auch G2-Phase, keine Verdoppelung des Reparaturdefekts, verglichen zu den einzelnen ATM- und Artemis-Depletionen. Dies zeigt, dass ATM und Artemis in beiden Zellzyklusphasen im gleichen Reparaturweg wirken. Interessanterweise zeigen MDC-1- und 53BP1-defizienten Zellen einen ähnlichen Reparaturdefekt wie ATM- und Artemis-defiziente Zellen in der G1- und G2-Phase. Epistasie Studien mit dem ATM-Inhibitor zeigen, dass MDC-1 und 53BP1 an dem ATM-abhängigen Reparaturweg in der G1- und G2-Phase beteiligt sind. Diese Ergebnisse beweisen, dass MDC-1 und 53BP1 Komponente des NHEJ in der G1-Phase sind. Erstaunlicherweise entspricht der ATM-, Artemis-, MDC-1- und 53BP1-Reparaturdefekt demjenige, der in HR-Mutanten beobachtet wurde. Dies warf die Frage auf, ob ATM, Artemis, MDC-1 und 53BP1 in der G2-Phase ebenfalls dem NHEJ-Reparaturweg zugehören, oder möglicherweise eine Funktion in der HR erfüllen. Um diese Frage näher zu untersuchen, wurden ATM und DNA-PKcs in HR-defizienten Zellen inhibiert. Beide Inhibitionen verursachen einen Reparaturdefekt in der G1-Phase in HR-defizienten Zellen. Dagegen verursacht nur die Inhibition des DNA-PKcs eine Erhöhung des HR-Reparaturdefekts in der G2-Phase. Die Inhibition von ATM hat keinen Einfluss auf das Reparaturverhalten von HR-Mutanten in der G2-Phase. Diese Ergebnisse

1. Zusammenfassung/Summary

deuten darauf hin, dass ATM und HR-Proteine an der gleichen Reparaturweg in der G2-Phase beteiligt sind. Dies läßt vermuten, dass ATM womöglich eine Rolle in der HR spielt. Unterstützt wurde diese Hypothese durch die Inhibition von ATM und DNA-PKcs in NHEJ-defizienten Zellen. Während Defizienzen in ATM und DNA-PKcs zu keiner weiteren Erhöhung des NHEJ-Reparaturdefekts in der G1-Phase führt, ist in G2-Zellen eine Erhöhung des NHEJ-Reparaturdefekts bei der ATM-, nicht aber bei der DNA-PKcs-Inhibition zu erkennen. Dadurch scheint ATM zwei unterschiedliche Funktionen in der DSB-Reparatur zu übernehmen, die abhängig von der Zellzyklusphase sind. Eine direkte Beteiligung von Artemis, 53BP1 und MDC-1 an der HR wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht nachgewiesen. Da diese Proteine an dem ATM-abhängigen Reparaturweg in der G2-Phase beteiligt sind, ist es durchaus vorstellbar, dass sie auch in der G2-Phase Komponente der HR sind.

Der zweite Teil dieser Arbeit beschäftigte sich mit der DSB-Reparaturanalyse von NHEJ (Nicht-Homologe End-Joining)- und HR (Homologe Rekombination)-Mutanten. Erwartungsgemäß zeigen NHEJ-Mutanten einen starken Reparaturdefekt in der G1-Phase, wo NHEJ der Hauptreparaturweg ist. Erstaunlicherweise zeigen diese Mutanten auch einen starken Reparaturdefekt in der G2-Phase, wo die HR doch als alternativer Reparaturweg neben NHEJ zur Verfügung steht. Mehr als 50 % der DSBs bleiben innerhalb der ersten 4 h nach Bestrahlung in der G1- und G2-Phase bei NHEJ-Mutanten unrepariert. Dementsprechend zeigen HR-Mutanten einen weitaus geringeren Reparaturdefekt als NHEJ-Mutanten in der G2-Phase. Dieser Defekt wird erst ab 4 h nach Bestrahlung zunehmend sichtbar. Nur 15 % der DSBs bleiben innerhalb der letzten vier Stunden nach Bestrahlung erhalten. Erwartungsgemäß zeigen HR-Mutanten ein ähnliches Reparaturverhalten wie WT-Zellen in der G1-Phase, da sie über ein funktionelles NHEJ verfügen. Diese Ergebnisse beweisen, dass NHEJ ein schneller Reparaturprozess ist, und für die Mehrheit der DSBs in der G1- und G2-Phase benötigt wird. Dagegen läuft die HR eher langsam und wird nur für eine Untermenge an DSBs benötigt. Anschließend wurde die DSB-Reparatur von verschiedenen NHEJ/HR-Doppelmutanten analysiert. Die Ergebnisse sind teilweise widersprüchlich. Während Defizienzen in beiden Hauptreparaturwegen in einigen Doppelmutanten zu einem Reparaturdefekt führt, der sich aus den einzelnen NHEJ- und HR-Defekten in der G2-Phase zusammenaddiert, ist es bei anderen Mutanten nicht der Fall gewesen. Stattdessen weisen diese Doppelmutanten ein ähnliches Reparaturverhalten wie NHEJ-Mutanten in der G2-Phase auf, als ob die zusätzliche Inaktivierung der HR keinen Einfluss hätte. Aufgrunddessen konnte in dieser Arbeit nicht eindeutig demonstriert werden, dass NHEJ und HR in der G2-Phase additiv sind.

1. Zusammenfassung/Summary

Zukünftige Experimente sollen durchgeführt werden, um die Funktion von ATM und ATM-Epistasisproteine in der HR näher zu charakterisieren. Außerdem sollten die Mechanismen geklärt werden, die für die Wahl des Reparaturwegs in der G2-Phase entscheidend sind.

Summary

The aim of this work was the analysis of the double strand break repair in wt cells and in cells, which have a mutation for some repair proteins of interest. This analysis was carried out in the G1 and G2 phase of the cell cycle. The γ H2AX-immunofluorescence microscopy was used for the detection of DSBs. This method allows the visibility of DSBs, even after low doses of ionizing radiation. Combined with specific cell cycle markers the γ H2AX-analysis has made it possible to study and to compare the repair behavior of G1 and G2 cells within the same cell population. The first part of the work deals with the double strand break repair in ATM, Artemis, MDC-1 und 53BP1 mutants. Both proteins ATM and Artemis have been described as factors of the NHEJ repair pathway. In fact they show a small and similar repair defect in the G0 phase. Both proteins are only required for the repair of a subset (10-15 %) of IR-induced DSBs (Riballo et al., 2004). It was now of interest to investigate the role of the ATM and Artemis dependent repair in proliferating cells. ATM and Artemis deficient cells show in G1 and in G2 a similar repair defect like in G0. About 15 % of DSBs remain unrepaired. ATM/Artemis double depleted HeLa cells do repair their DSBs nearly as efficiently as the ATM and Artemis depleted cells alone. This shows that ATM and Artemis work in both phases in the same repair pathway. Interestingly the repair defect observed in MDC-1 and 53BP1 mutants is similar to that of the ATM and Artemis mutants. Epistasis studies with the ATM inhibitor show that 53BP1 and MDC1 are involved in the ATM dependent repair in G1 and G2. These results demonstrate that MDC-1 and 53BP1 are factors of NHEJ in G1. Interestingly, the ATM and Artemis repair defect and therefore this of MDC-1 and 53BP1 are the same as this, which is also observed in HR mutants. This raised the question of whether ATM and Artemis also belong to the NHEJ pathway in the G2 phase, or might fulfill a function in the HR. To answer this question, epistasis studies with both ATM and DNA-PKcs inhibitors were performed in NHEJ and HR mutants. The use of the specific ATM and DNA-PKcs inhibitors in HR deficient cells shows that ATM and the HR proteins are involved in the same repair pathway in G2. In fact the inhibition of ATM and DNA-PKcs causes a repair defect in HR mutants in G1, whereas only the inhibition von DNA-PKcs does increase the HR repair defect in G2. The inhibition of ATM doesn't affect the repair behavior of HR mutants. These results suggest that ATM might assume a role in HR in G2. The results,

1. Zusammenfassung/Summary

which are obtained after the inhibition of DNA-PKcs and ATM in NHEJ-deficient cells do support this hypothesis. In fact the inhibition of DNA-PKs and ATM in the NHEJ mutants doesn't increase their strong repair defect in G1, whereas an additional repair defect was recognized after the ATM but not the DNA-PKcs inhibition in G2. According to these results ATM appears to have two different functions in the DSB repair, dependent of the cell cycle phase. A function of the proteins Artemis, MDC-1 and 53BP1 was in this work not demonstrated. Since these proteins belong to the ATM epistasis group in G1 and G2, it might be conceivable that they are factors of the HR in G2 like ATM.

The second part of the work deals with the double strand break repair of NHEJ (non homologous end joining) and HR (homologous recombination) mutants. As expected NHEJ mutants show a strong repair defect in the G1 phase, as NHEJ is the main repair pathway in G1. Surprisingly, these mutants show too a similarly strong repair defect in the G2 phase, where HR is available as an alternative repair pathway to NHEJ. More than 50 % of the DSBs remain within the first four hours post irradiation unrepaired. These results demonstrate that NHEJ plays a dominant role in G2. Accordingly, HR mutants show a much lower repair defect compared to that of NHEJ mutants in G2. The HR repair defect is becoming increasingly visible from four hours post irradiation. About 15 % der DSBs remain unrepaired. As expected HR mutants show a similar repair efficiency to that of wild type cells in G1, as the HR is suppressed there. In conclusion the majority of DSBs is repaired quickly through the NHEJ repair pathway. The last part of the work deals with the DSB repair of NHEJ/HR double mutants. The obtained results are partially contradictory. Some double mutants show an additive repair defect in G2 as to be expected and the other don't. Instead, these double mutants show an similar repair behavior like NHEJ mutants, suggesting that the HR inactivation doesn't have any effect. Thus it could not be concluded clearly in this work that NHEJ and HR are additive in G2.

Further experiments need to be carried out to characterize closer the function of ATM and ATM epistasis proteins in the HR repair pathway and to determine under which conditions the two main repair mechanisms NHEJ and HR may interact with each other.

2. Einleitung

2.1. Physikalische und biologische Grundlagen der Strahlenforschung

2.1.1. Physikalische Grundlagen

Der Mensch ist unterschiedlichen Strahlungsarten ausgesetzt. Im Allgemeinen kann Strahlung als eine Energieform definiert werden, die sich als elektromagnetische Welle oder als Teilchenstrom durch Raum und Materie verbreitet („Strahlung und Strahlenschutz“, Bundesamt für Strahlenschutz). Als Strahlungsarten kann man infrarote Wärmestrahlung, UV-Strahlung, Teilchenstrahlung und Röntgenstrahlung erwähnen. Sie lassen sich durch ihre physikalischen Eigenschaften nicht voneinander unterscheiden (Teilchenstrahlung ausgenommen), sondern nur durch ihre mitgeführte Energie und deren Wirkung.

Man unterscheidet ionisierende und nicht ionisierende Strahlung. Ionisierende Strahlung kann Stoffe durchdringen und die darin enthaltenden Atome und Moleküle ionisieren und anregen. Durch die Ionisation wird ein Elektron aus der Atomhülle entfernt, d.h. aus elektrisch neutralen Atomen und Molekülen werden positiv und negativ geladene Teilchen gebildet. Durch die Anregung wird ein Elektron in der Hülle von einem unteren auf ein höheres Energieniveau verschoben. Ist die Energie der Strahlung nicht hoch genug z.B. Infrarotstrahlung, um Ionisierungsvorgänge hervorzurufen, spricht man von nicht-ionisierender Strahlung. Zur Kategorie der ionisierenden Strahlung gehören hochenergetische UV-Strahlen, elektromagnetische Strahlen wie Röntgen- und Gammastrahlung, leichte geladene Teilchen wie Elektronen und schwere Teilchen wie Ionen (Gerthsen und Vogel et al., 1993).

Je nach Ionisationsdichte kann die ionisierende Strahlung als dünn oder dicht ionisierend bezeichnet werden. Der Unterschied liegt dabei in der unterschiedlichen räumlichen Verteilung der Energiedeposition. Bei dünn ionisierender Strahlung sind die Ionisationsereignisse weit voneinander entfernt und relativ homogen im Zellkern verteilt. Röntgenstrahlung zählt wegen ihres geringen Ionisierungsvermögens zu den dünn ionisierenden Strahlungsarten. Schwere geladene Teilchen wie Alphateilchen und Schwerionen (Teilchenstrahlung) gehören dagegen zu den dicht ionisierenden Strahlungsarten. Bei dicht ionisierender Strahlung treten die Ionisationsereignisse in Clustern auf und sind ungleichmäßig entlang ihrer Bahnspur im Zellkern verteilt. Die lokale

2. Einleitung

Ionisationsdichte der Teilchenspur hängt von der Ladung, der Masse und der Energie des primären Teilchens ab. Der Durchmesser der Ionisationsspur hängt von der primären Ionisationsenergie ab. Innerhalb dieser Spur nimmt die Dosisdeposition radial mit dem Quadrat des Abstandes vom Spurzentrums ab. Im Inneren der Spur erfolgt die Energieabgabe auf einem extrem kleinen Raum. Der Begriff der Ionisationsdichte wurde erweitert und durch den Linearen Energietransfer (LET) ersetzt (Zirkle, 1940). Der LET ist ein indirektes Maß für die Zahl der Ionisationen pro Wegstrecke. Der LET geladener Teilchen in einem Medium ist definiert als der Quotient aus dem mittleren Energieverlust, den das Teilchen durch Stöße erleidet und dem dabei zurückgelegten Weg des Teilchens. Ein hoher LET ist bei dicht ionisierenden Strahlenarten zu beobachten.

Im Gegensatz zur Teilchenstrahlung wird bei elektromagnetischer Strahlung wie Röntgen- und Gamma-Strahlung keine Materie sondern nur Energie in Form von Photonen transportiert. Beide Strahlungsarten unterscheiden sich durch ihre Entstehungsquellen voneinander. Gamma-Strahlung entsteht beim Kernzerfall während Röntgenstrahlung beim Abbremsen von energiereichen Elektronen an der Anode einer Röntgenröhre erzeugt wird. Dazu werden an der Kathode Elektronen erzeugt und durch Anlegen einer Spannung zwischen 30 und 150 kV zur Anode beschleunigt. Die beschleunigten Elektronen werden durch einen negativ geladenen Zylinder (Wehnelt-Zylinder) geschickt, der sie zu einem punktförmigen Strahl auf die Anode bündelt, wo sie abgebremst werden. Dabei wird Röntgenstrahlung erzeugt. Die entstandene Wärme wird auf der Anode verteilt und mittels Strahlungskühlung an das Röhrengehäuse abgegeben. Je höher die angelegte Röhrenspannung, mit der die Elektronen beschleunigt werden, ist, desto durchdringender ist die Strahlung. Durchdringt ionisierende Strahlung Stoffe, so tritt sie mit den Atomen in Wechselwirkung. Bei der Art der Wechselwirkung ionisierender Strahlung mit der Materie kann zwischen Photoeffekt, Comptoneffekt und Paarbildung unterschieden werden. Alle drei Wechselwirkungsprozesse überlagern sich, wobei je nach der Energiestärke einer der Prozesse dominiert.

Bei dem Photoeffekt wird die gesamte Energie eines Photons auf ein Hüllelektron übertragen. Das Elektron wird aus der Elektronenhülle des Atoms herausgeschlagen, das Photon vollständig absorbiert. In Abhängigkeit der Energiestärke des Photons werden hauptsächlich ein oder mehrere Elektronen aus den unteren Schalen der Elektronenhülle, vor allem der K-Schale herausgeschlagen, andere Elektronen aus den äußeren Schalen besetzen die freigewordene Position des Photoelektrons und verlieren dabei Energie, die in Form von

2. Einleitung

charakteristischer Röntgenstrahlung abgegeben wird. Der Photoeffekt kommt meist bei relativ kleinen Strahlungsenergien vor. Bei dem Comptoneffekt überträgt das Photon nur einen Teil seiner Energie auf ein freies Elektron. Beide Partner fliegen nach dem Zusammenstoß in verschiedenen Richtungen auseinander. Das Photon, das nun eine geringere Energie besitzt, setzt auf seinem weiteren Weg zusätzliche Elektronen durch weitere Ionisationen frei (Sekundärelektronen), bis es soviel Energie verloren hat, dass es durch einen Photoeffekt vollständig absorbiert wird. Bei mittlerer und hochenergetischer Strahlung tritt der Comptoneffekt stärker als der Photoeffekt auf (Stolz, 2005). Die Paarbildung dominiert bei hohen Strahlungsenergien. Bei der Paarbildung wird im Bereich des Atomkerns das einfallende Photon vernichtet und es entstehen ein Elektron und ein Positron als Paar. Die dafür notwendige Energie beträgt mindestens 1,022 MeV.

Zur Messung der durch Strahlung deponierten Energiemenge bedient man sich des Begriffs der Dosis und ihre Einheit ist das *Gray*. Ein *Gray* ist definiert als ein Joule pro Kilogramm ($1 \text{ Gy} = 1 \text{ J/Kg}$). Allerdings reicht bei der Beschreibung der Wirkung ionisierender Strahlung auf biologisches Material die Angabe der Energiedosis nicht aus. Alpha-, Beta-, Gamma-, Neutronen-, Protonen - und Schwerionen-Strahlen sind bei gleicher Energiedosis (Gy) unterschiedlich wirksam. Um diese unterschiedlichen Strahlenarten besser bewerten zu können, werden Strahlenwichtungsfaktoren einbezogen. Durch Multiplikation der Energiedosis mit einem Strahlenwichtungsfaktor erhält man die Äquivalentdosis. Sie hat die Einheit Sievert (Sv). So hat 1 Gy Alphastrahlung die gleiche Wirkung wie 20 Gy Gamma-Strahlung. Die Äquivalentdosis ist in beiden Fällen 20 Sv.

2.1.2. Biologische Grundlagen

Ionisierende Strahlung kann zu Schäden der molekularen Strukturen einer Zelle führen. Ein Gray entspricht 1 J/kg bzw. $6 \times 10^{18} \text{ eV/kg}$. Eine einzelne Zelle absorbiert bei einer applizierten Dosis von 1 Gy etwa $6 \times 10^6 \text{ eV}$. Mit dieser Energie können 10^5 - 10^6 kovalente Bindungen aufgebrochen werden (WWW.uni-ulm.de/.../kurse/Vorlesung_Grundlagen-Anw-Ionisierender-Strahlen_09_01_2007.pdf). Dabei zeigen die biologischen Strukturen einer Zelle unterschiedliche Empfindlichkeiten. So hat Strahlung eine relativ geringe Wirkung auf Proteine. Die Proteindenaturierung, die durch Strahlung verursacht wird, kann aufgrund der Konformationsänderung zum Funktionsverlust des Proteins führen. Dies bleibt für die betroffene Zelle zumeist ohne negative Folgen, da geschädigte Proteine schnell wieder resynthetisiert werden können. Auch Polysaccharide sind biologische Moleküle, die auf Strahlung ziemlich unempfindlich reagieren, da sie durch den Metabolismus ständig erneuert

2. Einleitung

werden können. Bei Lipiden können durch Strahlung Peroxide gebildet werden, die die Membranpermeabilität beeinflussen können. Der Einfluss dieser Schäden nach Bestrahlung ist jedoch meist gering. So haben Schäden an Strukturelementen wie Membranen oder Kanalproteinen erst ab eine Dosis > 20 Gy Einfluss auf das Zellüberleben (www.as.hu.de/pdfs/strahlenbiophysik.pdf). Dagegen reagiert die DNA hochempfindlich auf ionisierende Strahlung. Schäden an der DNA können bereits bei $< 0,1$ Gy die Zelle töten oder Mutationen auslösen.

Die Schädigung der DNA kann dabei direkt oder indirekt erfolgen (Abb. 2.1.).

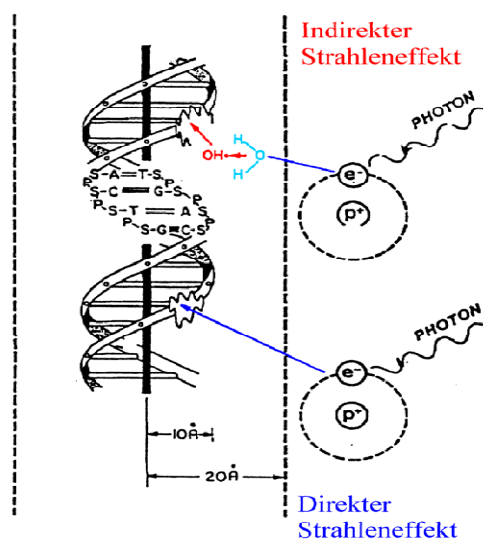


Abb 2.1. Direkte und indirekte Wirkung ionisierender Strahlung (Aus Hall, 2000). Werden Schäden an der DNA durch Photonen bzw. schnelle sekundäre Elektronen selbst erzeugt, so liegt eine direkte Wirkung vor. Wegen der hohen lokalen Energiedichte sind bei solchen Treffern Mehrfachschäden an der DNA zu erwarten. Durch die Radiolyse von Wassermolekülen werden freie Radikale erzeugt, die mit der DNA in Wechselwirkung treten und dabei dauerhaft Veränderungen induzieren können. Der Schaden ist in diesem Fall chemisch vermittelt und die Strahlenwirkung dabei indirekt.

Die Schädigung erfolgt direkt, wenn die mit der Strahlung transportierte Energie unmittelbar an der DNA abgegeben wird. Dabei werden Basen oder Zucker der DNA ionisiert (Ward, 1988). Ionisierende Strahlung kann aber auch direkt zu Einzel- oder Doppelstrangbrüchen führen. Die direkte Wirkungsweise überwiegt bei der Teilchenstrahlung. Dagegen wirkt ionisierende Strahlung indirekt, indem sie mit einem Wassermolekül der Umgebung reagiert. Durch die Reaktion mit dem Wassermolekül entstehen zuerst Wasserradikale und sekundäre Produkte der Radiolyse wie z.B. Peroxidradikale, die zu den biologischen Geweben durchdringen und sie schädigen können. Der indirekte Effekt überwiegt bei dünn ionisierender Strahlung (Röntgenstrahlung). Wegen dem mengenmäßigen Vorherrschen in allen Lebewesen ist Wasser das primäre Ziel ionisierender Strahlung. Es wird geschätzt, dass nahezu die gesamte absorbierte Energie bei der Radiolyse von Wasser verbraucht wird (Riley, 1994; Ward, 1988). Strahleninduzierte Schäden an der DNA umfassen Einzelstrangbrüche, Doppelstrangbrüche, Basenveränderungen (Friedberg et al., 2006), Basenverluste (Loeb and Preston, 1986), Quervernetzung der komplementären Stränge und DNA-Protein-Vernetzungen (Abb. 2.2.). Im Fall von Einzelstrangbrüchen ist das Zucker-Phosphat-Rückgrat der DNA auf einem

2. Einleitung

Strang unterbrochen. Einzelstrangbrüche sind für die Zelle weniger kritisch und können schnell und effizient repariert werden. Doppelstrangbrüche entstehen dagegen, wenn beide Zucker-Phosphat-Stränge in der DNA unterbrochen sind. DSBs haben eine wesentliche Rolle bei der Entstehung von Chromosomenaberrationen, und können zum Zelltod und zur Tumorentstehung führen. Die chemische Veränderung der DNA-Basen durch ionisierende Strahlung wird ebenfalls in der Regel sehr schnell repariert. Der Verlust einer Base kann Raster-Mutationen hervorrufen, deren Folgen die Synthese eines nicht funktionierenden Proteins während der Translation ist. Im Fall von DNA-Vernetzungen werden nebeneinander liegende Basen vernetzt. Dies kann die Blockade der DNA-Synthese verursachen.

1 Gy Gamma-Strahlung verursacht in einer Zelle 1000 bis 2000 Basenschäden, ca. 600 bis 1000 DNA-Einzelstrangbrüche und ca. 10 bis 40 DNA-Doppelstrangbrüche (Ward, 1988).

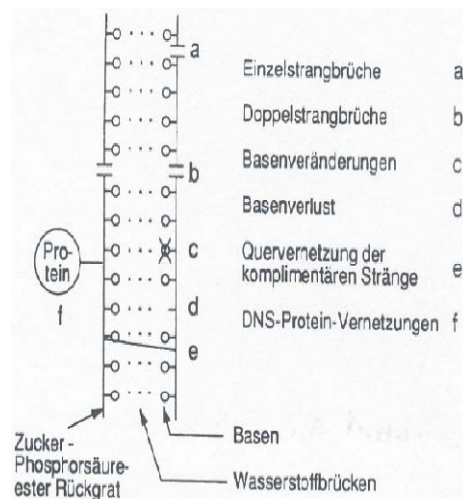


Abb. 2.2. Schädigungsmöglichkeiten der DNA (http://e3physikunidortmund.de/~suter/Vorlesung/Medizin_physik_07/11_Strahlung.pdf). Einzelstrangbrüche entstehen wenn das Zucker-Phosphat-Rückgrat der DNA auf einer Seite unterbrochen ist. Dagegen sind bei Doppelstrangbrüchen beide Zucker-Phosphat-Stränge entweder in derselben Höhe („glatter Bruch“ wie unter b dargestellt) oder um einige wenige Basenpaare versetzt (überlappender Bruch) unterbrochen. Basenveränderungen entstehen durch Einfügen bzw. Entfernen funktioneller Methyl- bzw. Hydroxyl-Gruppen aus den DNA-Basen. Bei diesem Vorgang können auch Basen vollständig verloren gehen. Quervernetzung entsteht, wenn jeweils zwei Basen beider komplementären DNA-Stränge kovalent miteinander verknüpft werden. Im Fall von DNA-Protein-Vernetzungen wird ein DNA-Strang mit dem Protein verknüpft.

2.2. Zelluläre Schadensantwort auf DNA-Doppelstrangbrüche

DSBs entstehen einerseits endogen durch zelleigene Stoffwechselwege (Friedberg et al., 1995; Friedberg et al., 2006) wie z.B. bei der Bildung freier Radikale. Desweiteren treten DSBs als natürliche Produkte bei Rekombinationsvorgängen im Zuge der Meiose und bei der Antikörperherstellung auf (Schrader et al., 2005). DSBs können auch durch Fehler bei der DNA-Replikation entstehen (Holliday und Ho, 2002; Degrossi et al., 2004). Andererseits können DSBs durch äußere Einflüsse wie ionisierende Strahlung (Sutherland et al., 2000) und verschiedene Chemotherapeutika hervorgerufen werden (Abb. 2.3.).

Bevor die Reparatur eingeleitet werden kann, muss der DNA-Schaden zunächst detektiert werden. Diese Aufgabe wird von Sensor-Proteinen übernommen, die danach

2. Einleitung

Transduktor/Mediator-Proteine phosphorylieren. Die modifizierten Transduktor/Mediator-Proteine amplifizieren das DNA-Schadenssignal, das an Effektor-Proteinen weitergeleitet wird (Kobayashi et al., 2008). Diese Effektor-Proteine regulieren die verschiedenen zellulären Antworten auf DNA-Schäden (Abb. 2.3.). Zu den Effektor-Proteinen zählen Proteine, die die Arretierung des Zellzyklus bei exponentiell wachsenden Zellen verursachen und damit genügend Zeit für die Reparatur der aufgetretenen DNA-Schäden zur Verfügung stellen. Transduktor- und Effektor-Proteine repräsentieren gemäß Kinzler und Vogelstein (1997) die wichtigsten Vertreter der *Caretaker* im Zusammenhang mit der Karzinogenese. Die fehlerhafte Arbeit dieser Proteine kann zu genetisch bedingten Erkrankungen führen, die sich durch besondere Sensitivität der betroffenen Patienten gegenüber bestimmten Mutagenen charakterisieren lassen.

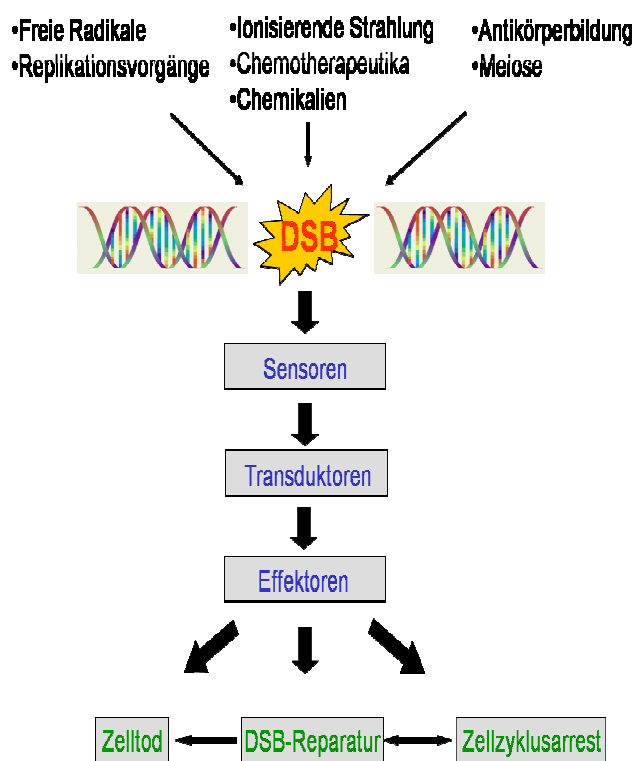


Abb 2.3. Ursachen von DSBs und Reaktionen der Zelle auf diese (Aus Khanna und Jackson, 2001). Beim Auftreten eines DSBs in der Zelle wird dieser von Sensoren erkannt, die Transduktoren/Mediatoren aktivieren. Diese Transduktoren/Mediatoren sind meist Proteinkinasen, die die DSB-Schadensantwort durch Phosphorylierung der Effektoren vermitteln. Die Effektoren leiten die Reparatur des Doppelstrangbruchs ein. Es kommt in der Zelle zu einem Zellzyklusarrest, um genügend Zeit für die Reparatur zur Verfügung zu stellen (Shiloh, 2003). Ist der DNA-Schaden zu gravierend, um behoben zu werden, wird die Apoptose in der Zelle eingeleitet.

Zellen können auf DNA-Schäden unterschiedlich reagieren: sie können durch die Aktivierung von Reparaturmechanismen die Schäden beseitigen, die Apoptose einleiten oder in die Seneszenz übergehen (z.B. bei Fibroblasten). Sowohl die Seneszenz als auch die Apoptose stellen tumorsuppressive Mechanismen dar, die durch irreparable DNA-Schäden eingeleitet werden. Während die Apoptose jedoch potenzielle Krebszellen beseitigt, wird bei der Seneszenz nur die Ausbreitung und Vermehrung solcher Zellen verhindert.

2. Einleitung

Reparable DNA-Schäden können durch unterschiedliche Reparaturmechanismen beseitigt werden. Basen- und Nukleotidschäden sowie Einzelstrangbrüche werden durch die Basenexzisionsreparatur (BER) oder die Nukleotidexzisionsreparatur (NER) beseitigt. Fehlgepaarte Basen werden durch die Mismatch-Reparatur (MMR) repariert. Dabei wird die geschädigte Stelle ausgeschnitten, entfernt und durch Einfügen komplementärer Basen wieder aufgefüllt (Friedberg et al., 2006; Boiteux und Guillet, 2004; Leppard et al., 2003; Hoeijmakers, 2001; Paques und Haber, 1999; Prasad et al., 1998; Sancar 1996). Zur Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSBs), bei denen beide DNA-Stränge geschädigt sind, existieren unterschiedliche Reparaturwege. Die Wahl des Reparaturwegs hängt von der Zellzyklusphase ab. Das Nicht-Homologe Endjoining (NHEJ) steht während des gesamten Zellzyklus zur Verfügung. Nach der Replikation der DNA kann in der S- und G2-Phase zudem die homologe Rekombination (HR), welche zur Reparatur die Schwesterchromatide als Templat heranzieht, verwendet werden.

DNA-Doppelstrangbrüche (DSBs) zählen zu den schwerwiegendsten Schäden, die im Erbgut auftreten. Verbleiben sie unrepariert, kann dies zum Verlust von genetischem Material führen und damit den Zelltod auslösen (Olive, 1998). In einer eukaryotischen Zelle kann bereits ein einziger nicht reparierter DSB in einem entscheidenden Gen den Tod der Zelle durch Apoptose induzieren (Richardson et al., 2000). Bei Fehlreparaturereignissen können Veränderungen im Genom das unkontrollierte Wachstum der Zellen auslösen und damit zum Auftreten von Krebs führen (van Gent et al., 2001; Hoeijmakers, 2001).

2.2.1. Erkennung von DNA-Doppelstrangbrüchen

Beim Auftreten eines DSBs bindet der MRN-Komplex (bestehend aus Mre11, Rad50 und NBS1) an die DNA-Bruchenden und rekrutiert aktiviertes ATM an den Bruch. Dies bewirkt die Phosphorylierung von der Histonisoform H2AX (γ H2AX) (Petrini et al., 2003; Redon et al., 2002; Rogakou et al., 1998). MDC-1 assoziiert mit γ H2AX und ist ebenfalls an der Rekrutierung von ATM an den DSB-Ort beteiligt (Lou et al., 2006; Stucki und Jackson, 2006). Die Wechselwirkung zwischen γ H2AX und MDC-1 führt zur Amplifikation des γ H2AX-Signals und zur Akkumulation weiterer Reparaturproteine wie MRN, 53BP1 und BRCA1 an den Schadensort (Bassing et al., 2004; Bassing et al., 2002; Stucki und Jackson, 2006). MDC-1 wird durch ATM phosphoryliert (Stewart et al., 2003; Goldberg et al., 2003), was die Rekrutierung der Ubiquitin E3 Ligase RNF8 bewirkt. RNF8 ubiquitiniert zusammen mit UBC13 H2AX (Huen et al., 2007; Mailand et al., 2007; Zhao et al., 2007). Tip60 acetyliert H2AX und dieser Acetylierungsschritt ist notwendig für die H2AX-Ubiquitinierung

2. Einleitung

durch UBC13 (Ikura et al., 2007). Die Acetylierung und Ubiquitinierung von H2AX durch den Tip60/UBC13-Komplex reguliert die Freisetzung der γ H2AX-Moleküle von dem Chromatin (Ikura et al., 2007). Die doppelte Acetylierung/Ubiquitinierung und Phosphorylierung von H2AX erfolgen unabhängig voneinander (Ikura et al., 2007). Rap80 erkennt die H2AX-Polyubiquitin-Ketten und interagiert mit BRCA1 (Wu et al., 2009). Diese Interaktion wird durch Abraxas vermittelt (Kim et al., 2007; Sobhian et al., 2007; Wang et al., 2007; Yan et al., 2007). Die Assoziation von Rap80 und BRCA1 reguliert auch die Akkumulation von BRCA1 an dem Schadensort (Kim et al., 2007; Liu et al., 2007). Die Polyubiquitinierung von H2AX und/oder andere bisher unbekannte Faktoren verursachen eine lokale Strukturänderung des Chromatins in unmittelbarer Nähe des DSBs. Dadurch wird das Schadenssignal verstärkt und die DSB-Reparatur beschleunigt (Abb. 2.4.). Die Relaxation des Chromatins verursacht außerdem die Exposition von methylierten Aminosäurenresten von H3/H4. Dies führt zur Rekrutierung von 53BP1 zum Schadensort (Xie et al., 2007). 53BP1 ist notwendig für die korrekte Aktivierung von mehreren Proteinen, die an der DNA-Schadensantwort beteiligt sind (Motoyama et al., 2003; Wang et al., 2002; DiTullio et al., 2002).

2. Einleitung

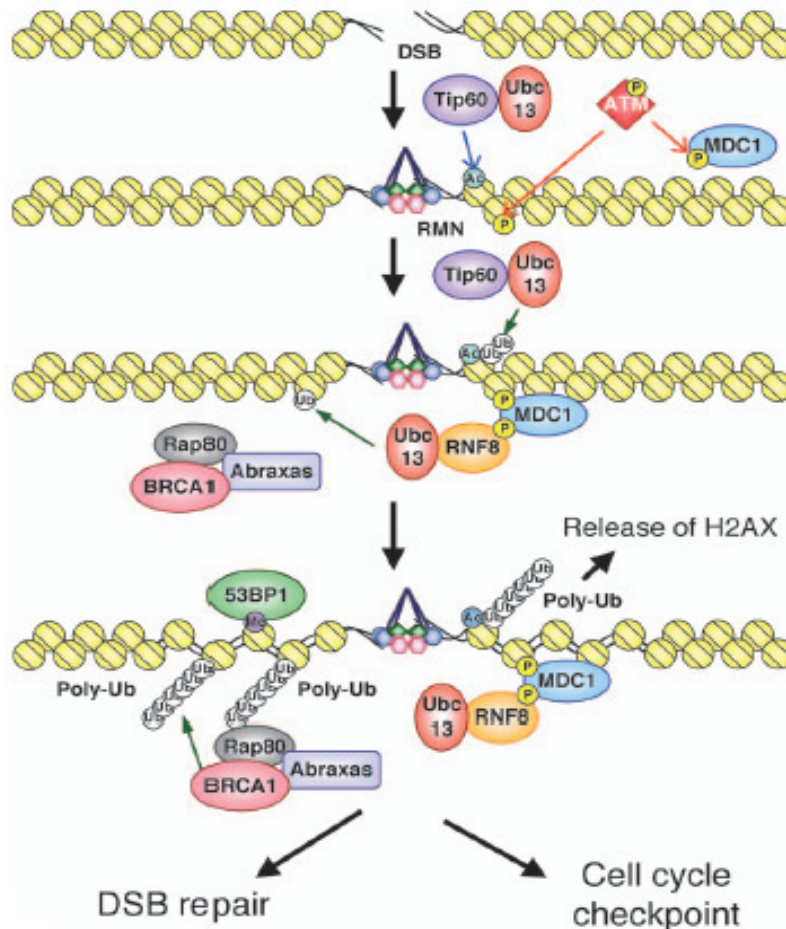


Abb. 2.4. Erkennung von DNA-DSBs im Zusammenhang mit Ubiquitin-vermitteltem Chromatin-Remodeling in Säugerzellen (Nach Iijima et al., 2008). Die DSB-Schadensantwort beginnt mit der Aktivierung von ATM (verursacht teilweise durch Autophosphorylierung und teilweise durch Interaktion mit MRN). ATM phosphoryliert H2AX und MDC-1. Phosphoryliertes H2AX (γ H2AX) rekrutiert MDC-1 an den DSB. Die Lokalisierung von MDC-1 bewirkt die Akkumulation von ATM und MRN (in der Abb MRN) am Schadensort. Phosphoryliertes MDC-1 interagiert mit RNF8. RNF8 und UBC13 ubiquitinieren H2AX. Für die Ubiquitinierung von H2AX durch UBC13 wird zuerst die Acetylierung von H2AX durch Tip60 benötigt. Rap80 erkennt die Polyubiquitin-Ketten von H2AX und rekrutiert Abraxas-BRCA1 zum Schadensort. Dadurch wird die H2AX-Polyubiquitinierung verstärkt. Diese Polyubiquitinierung stimuliert die Beweglichkeit von H2AX-Molekülen, so dass sie von dem Chromatin freigesetzt werden. Es kommt zum Chromatin-Remodeling und die DNA-Bruchenden werden für Reparaturproteine zugänglich. Die Bruchenden werden resektiert und der dabei entstandene Einzelstrang wird von RPA gebunden. Die Exposition von methylierten Aminosäureresten von H3/H4, verursacht durch die Relaxation des Chromatins, bewirkt die Akkumulation von 53BP1 am Schadensort. 53BP1 ist an der DSB-Reparatur beteiligt und ist notwendig für die Aktivierung einer Reihe an Reparaturproteinen. Das effiziente Chromatin-Remodeling aktiviert nicht nur die DSB-Reparatur durch homologe Rekombination, sondern auch die Zellzyklus-Checkpoints.

2.2.2. Die Regulation des Zellzyklus im Zusammenhang mit Checkpoint-Proteinen.

Im Verlauf des Zellzyklus wird das Genom einer Zelle verdoppelt und auf zwei Tochterzellen verteilt. Der Zellzyklus lässt sich in der G1-, S-, G2- und der M-Phase einteilen. In der G1-Phase wird die Zelle auf die DNA-Replikation vorbereitet, die in der S-Phase stattfindet. In der G2-Phase werden die Zellgröße und die replizierte DNA auf mögliche Fehler bei der

2. Einleitung

Replikation überprüft. Anschließend werden in der Mitose die Chromosomen aufgetrennt und die eigentliche Zellteilung findet statt. Danach kann die Zelle in der darauf folgenden G₁-Phase einen neuen Zellzyklus starten. Zellen, die sich aufgrund ungünstiger Verhältnisse wie Kontaktinhibition, Nährstoffmangel oder dem Fehlen von Wachstumsfaktoren nicht teilen können, verbleiben in einer dauerhaften Ruhephase (G₀-Phase). Um den aktiven Zellzyklus wieder aufzunehmen, muss die Zelle durch Zugabe von Wachstumsfaktoren stimuliert werden, um wieder in der G₁-Phase einzutreten. Danach wird der Zellzyklus unabhängig von äußeren Signalen durchlaufen.

Die Zellzyklusprogression kann von speziellen Kontrollpunkten (Checkpoints) verzögert werden (Bharadwaj et al., 2004; Malumbres et al., 2001), wenn die Bedingungen für die Zelle zur nächsten Zellzyklusphase nicht erfüllt sind. Der erste Checkpoint befindet sich am Übergang von der G₁- zur S-Phase (G₁/S-Checkpoint), der zweite am Übergang von der G₂- zur M-Phase (G₂/M-Checkpoint) (Pellegata et al., 1996; Agami und Bernards, 2000). Beim G₁/S-Checkpoint wird überprüft, ob eine ausreichende Zellgröße erreicht ist und ob keine DNA-Schäden vorliegen. Beim G₂/M-Checkpoint wird kontrolliert, ob die DNA erfolgreich repliziert wurde und keine DNA-Schäden vorliegen (Löffler und Petrides, 2003). Bei aufgetretenen Fehlern wird der Zellzyklus angehalten, um der Zelle die Zeit zu geben, den DNA-Schaden zu beheben. Neben den erwähnten Checkpoints gibt es zudem einen S-Phase-Checkpoint (Abb. 2.5.). Allerdings sind bei diesem die molekularen Zusammenhänge bei Säugerzellen noch relativ unbekannt (Duncan Clarke et al., 2002).

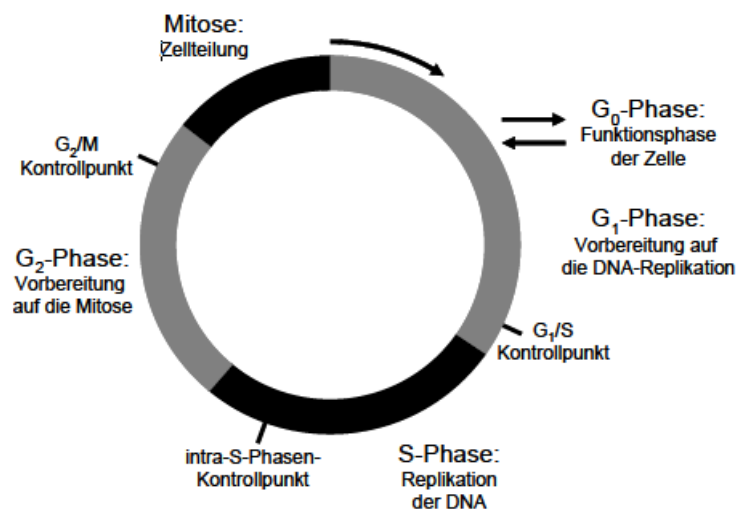


Abb. 2.5. Abfolge der Zellzyklusphasen bei eukaryotischen Zellen. Auf die G₁-Phase folgt die S-Phase, in der die DNA repliziert wird. Darauf folgt eine Phase, in der sich die Zelle auf die Teilung in der Mitose

2. Einleitung

vorbereitet. Am Ende der G1- und G2-Phase und in der S-Phase befinden sich Checkpoints (Kontrollpunkte) an denen über den weiteren Durchlauf des Zellzyklus entschieden wird. Zellen, die keine Teilungsaktivität zeigen, werden der G0-Phase zugeordnet (Quelle: Dissertation Marcus Winter).

Die Entscheidung zum Überschreiten eines Checkpoints hängt sowohl von externen Faktoren, wie beispielweise Wachstumsfaktoren, aber auch von internen Mechanismen zur Regulation der Zellzykluskontrolle ab. Die Expression der Cycline und die damit verbundene Aktivierung der CDKs (Cyclin-abhängige Proteinkinase) sind am Anfang der G1-Phase von den Wachstumsfaktoren abhängig. Die Kombinationen von Cyclinen und CDKs sind zellzyklusabhängig (Abb. 2.6.). Ein Verlust der Zellzykluskontrolle und die daraus resultierende unkontrollierte Proliferation sind ein Charakteristikum von Tumorzellen (Eisenbrand et al., 2004).

Bei der Regulation des Zellzyklus nach dem Auftreten eines DNA-Schadens, spielen die Proteinkinasen ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*)- und ATR- (*ATM and -Rad3-related*) eine wichtige Rolle. DSBs führen zur Aktivierung von ATM. Dabei kommt es zur Autophosphorylierung des Proteins (Appella und Anderson, 2001). Das inaktive Dimer zerfällt in zwei aktive Monomere. Dagegen wird ATR nach dem Auftreten einzelsträngiger Bereiche, die beispielweise durch blockierte Replikationsgabeln entstehen, aktiviert (Hurley et al., 2007). Diese einzelsträngigen Bereiche werden von dem Einzelstrang-bindenden Protein RPA erkannt und gebunden. Die Aktivierung von ATR erfolgt durch den direkten Kontakt von ATRIP (*ATR-Interacting-Protein*) mit RPA (Cortez et al., 2001). Nach derer Aktivierung phosphorylieren beide Proteinkinasen verschiedene Zielproteine, darunter die Checkpoint-Kinasen Chk1 und Chk2 (Shiloh, 2003; Khanna und Jackson, 2001). Chk1 und Chk2 phosphorylieren die Phosphatasen Cdc25A und Cdc25C und verursachen deren Inaktivierung. Dies verhindert die Dephosphorylierung der Komplexe Cdk2-Cyclin E und Cdc2-Cyclin B und damit deren Aktivierung (Falck et al., 2001; Falck et al., 2002). Dadurch wird der Zellzyklusarrest in der G1-, S- und der G2-Phase induziert. Dies erfolgt unabhängig von p53. Chk1 und Chk2 können auch einen p53-abhängigen G1-Arrest durch Phosphorylierung von p53 bewirken. Dadurch wird die Bindungsaffinität von p53 für MDM2 vermindert und die Stabilität bzw. die Aktivität von p53 erhöht. Allerdings können ATM und ATR auch einen G1-Arrest durch direkte Phosphorylierung von p53 bewirken (Canman et al., 1998; Banin et al., 1998). p53 aktiviert p21, das die Blockade des Zellzyklus in G1 bewirkt (Abb. 2.6.).

ATM übernimmt eine Funktion sowohl im Zellzyklusarrest als auch in der DNA-Reparatur, indem es den G1/S-, intra S-, G2/M-Checkpoint durch Aktivierung von p53 (Khanna et al.,

2. Einleitung

1998; Waterman et al., 1998) oder cAbl (Baskaran et al., 2001; Shafman et al., 1997) induziert und Reparaturproteine wie NBS1 (Gatei et al., 2000), Mre11 (Dong et al., 1999), H2AX (Burna et al., 2001), MDC-1 (*Mediator of DNA-Damage Checkpoint protein 1*) (Bao et al., 2001; Goldberg, 2003), BRCA1 (*Breast Cancer 1*) (Cortez et al., 1999), SMC1 (*Structural maintenance of chromosome 1*) (Kim et al., 2002), p53 (Banin et al., 1998), RPA (Wang et al., 2001), Artemis (Chen et al., 2005; Riballo et al., 2004) und DNA-PKcs (Chen et al., 2007) phosphoryliert (Abb. 2.6.).

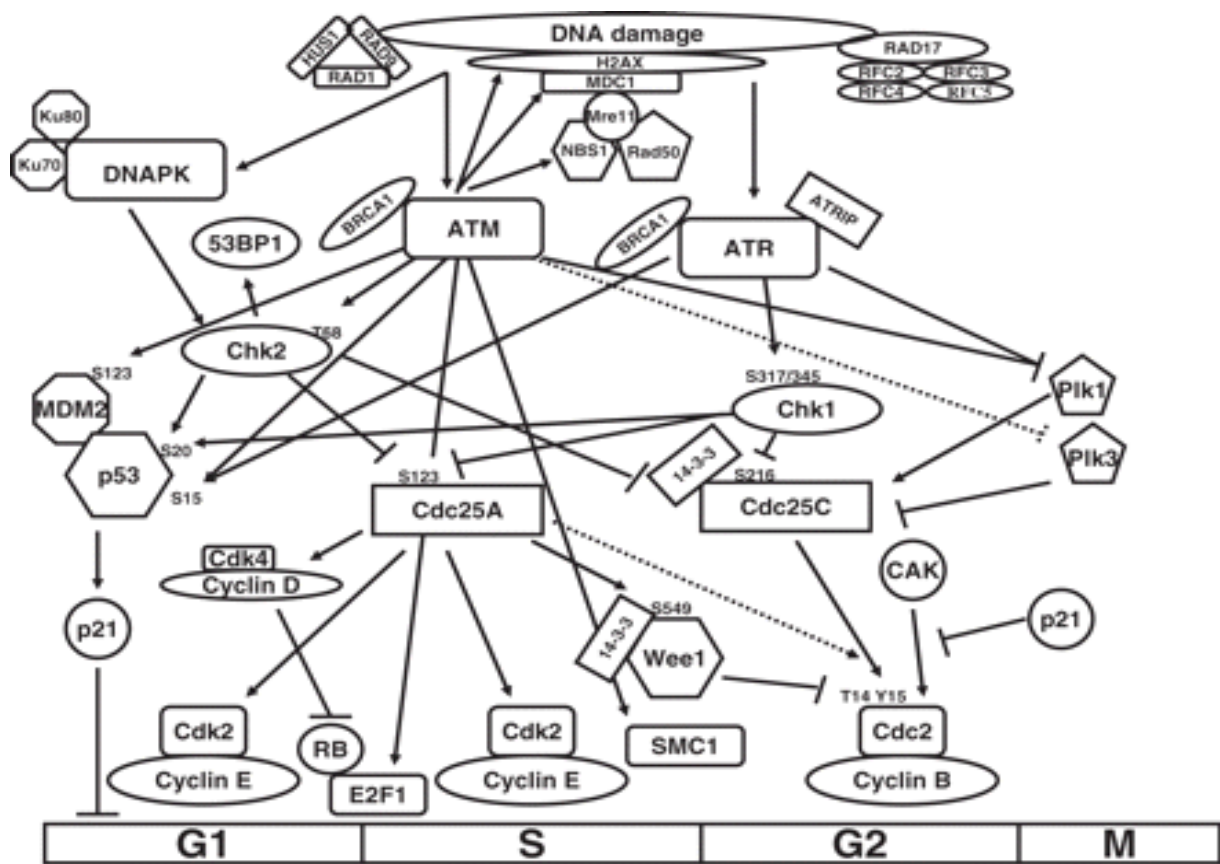


Abb. 2.6. Schematische Darstellung der verschiedenen DNA-Checkpoints im Zellzyklus (Aus Niida und Nakanishi, 2006). Durch Vorhandensein eines DNA-Schadens werden die Kinasen ATM und ATR aktiviert. ATM und ATR phosphorylieren eine Reihe von Proteinen, die an der Zellzykluskontrolle, DNA-Reparatur und Stressreaktionen eine Rolle spielen

Ist das Schadenausmaß in einer Zelle zu hoch, um in angemessener Zeit repariert werden zu können, so wird die Apoptose eingeleitet. Bei diesem Prozess spielt das Protein p53 ebenfalls eine bedeutende Rolle, der zum Absterben der Zelle führt (Christmann, 2003; Sancar, 2004).

2. Einleitung

2.3. Reparaturwege von DNA-Doppelstrangbrüchen

2.3.1. Das Nicht Homologe End-Joining (NHEJ)

NHEJ bezeichnet einen Mechanismus, bei dem DNA-Enden sehr schnell und wirkungsvoll miteinander verknüpft werden, ohne dass dabei eine homologe Sequenz benötigt wird (Critchlow and Jackson, 1998). Bei diesem Mechanismus wird nicht geprüft, ob die verbundenen DNA-Enden auch vor Eintritt des DNA-Schadens miteinander verknüpft waren. Deshalb können bei diesem Prozess Mutationen entstehen, entweder weil Teile der DNA an der Bruchstelle verloren gehen oder weil die falschen Enden miteinander verknüpft werden. Aufgrund der ausgedehnten nicht-kodierenden DNA-Bereiche, die höchstwahrscheinlich den größten Teil des menschlichen Genoms repräsentieren, betreffen entstehende Mutationen nur selten kodierende DNA-Sequenzen und bleiben ohne negative Folgen. NHEJ ist in allen Zellzyklusphasen (G0/G1, S und G2) aktiv, findet aber hauptsächlich in der G0/G1-Phase des Zellzyklus statt (Johnson und Jasin, 2000; Takata et al., 1998). NHEJ-Mutanten sind empfindlich gegenüber ionisierender Strahlung und haben einen starken Reparaturdefekt (Chang et al., 1993; Riballo et al., 1999; Wachsberger et al., 1999). NHEJ-Proteine sind auch an der V(D)J-Rekombination der Immunglobulingene in B- und T-Zellen (Taccioli et al., 1993) und am Immunglobulin-*class switch* (Casellas et al., 1998; Manis et al., 2002; Rolink et al., 1996) beteiligt.

Beim Auftreten eines DSBs bindet das Ku70/Ku80-Heterodimer an die freien DNA-Enden (Reeves und Sthoeger, 1989; Jeggo et al., 1992; Ramsden and Gellert, 1998) und schützt diese so vor dem Abbau durch Exonukleasen (Getts und Stamato, 1994). Nach der Bindung des Proteinheterodimers an die geschädigte DNA erfolgt die Rekrutierung der katalytischen Untereinheit der DNA-PK, DNA-PKcs (Sipley et al., 1995; Hartley et al., 1995). DNA-PKcs bildet zusammen mit dem Ku70/Ku80-Heterodimer den DNA-PK-Komplex (Gottlieb und Jackson, 1993; Smith und Jackson, 1999). DNA-PKcs ist eine Serin/Threonin-Proteinkinase, deren Aktivierung zur Phosphorylierung mehrerer Proteine führt, die für den Fortschritt der Reparatur von Bedeutung sind. Die aktivierte DNA-PKcs phosphoryliert einige DNA-bindende Proteine (Anderson et al., 1992), darunter den Ku-Komplex (Lees-Miller et al., 1990; Chan et al., 1999; Labhart et al., 1999) und XRCC4 (Leber et al., 1998; Calsou et al., 2003). Nach der Autophosphorylierung der DNA-PKcs (Ding et al., 2003; Reddy et al., 2004; Weterings et al., 2003) erfolgt die Dissoziation von der DNA (Chan et al., 1996) und die DNA-Enden werden für die Ligation durch den Ligase4-Komplex (bestehend aus Ligase4, XRCC4 und XLF) zugänglich (Abb. 2.7. links).

2. Einleitung

Die Rolle von XRCC4 im NHEJ ist noch nicht vollständig aufgeklärt. XRCC4 verstärkt die Bindungseffizienz von Ligase4 in vitro (Grawunder et al., 1997). Cernunos/XLF wurde zeitgleich von zwei unabhängigen Laborgruppen charakterisiert (Buck et al., 2006; Ahnesorg et al., 2006) und interagiert in vitro mit Ligase4 (Ahnesorg et al., 2006; Callebaut et al., 2006). Vermutlich werden XRCC4 und XLF benötigt, um Ligase4 an die DNA-Enden zu bringen. Es konnte gezeigt werden, dass neben den klassischen NHEJ-Komponenten weitere Proteine eine Rolle im NHEJ spielen. Der MRN-Komplex (bestehend aus Mre11, Rad50 und NBS1) ist vermutlich an der Erkennung der Bruchenden sowie am Zusammenhalten der DNA-Enden beteiligt (Moreno-Herrero et al., 2005; Hopfner et al., 2002; de Jager et al., 2001). Außerdem kann die Mehrzahl der DSBs nicht einfach ligiert werden, da die DNA-Enden Modifikationen aufweisen, die vor der Ligation prozessiert werden müssen. So treten zum Beispiel anormale 3' Phosphat- bzw. 5' Hydroxyl-Gruppen, geschädigte DNA-Basen sowie geschädigte Zucker-Phosphorsäureester im Rückgrat der DNA auf. DNA-Enden mit anormalen 3' Phosphat- bzw. 5' Hydroxyl-Gruppen werden mit Hilfe der Polynukleotidkinase, die mit XRCC4 interagiert, prozessiert (Chappell et al., 2002; Koch et al., 2004). Andere nicht ligierbare DNA-Bruchenden werden möglicherweise von der Nuklease Artemis prozessiert, indem sie überschüssige DNA-Einzelstränge oder Hairpin-Strukturen entfernt (Ma et al., 2002; Moshous et al., 2001). Außerdem kann die Exonuklease WRN, die bei Patienten mit dem Werner-Syndrom mutiert ist, andere Klassen von DNA-Enden prozessieren (Perry et al., 2006). Es wird weiterhin angenommen, dass die Proteine ATM und Artemis an der Reparatur von einer Subpopulation von DSBs beteiligt sind, die mit einer langsameren Kinetik beseitigt werden (Riballo et al., 2004). Mehrere DNA-Polymerasen füllen nach erfolgter Prozessierung die Lücken in der DNA auf (McElhinny et al., 2005).

2.3.2. Die Homologe Rekombination (HR)

Bei der homologen Rekombination werden zum Bruchbereich homologe Sequenzen als Matrize verwendet. Grundsätzlich sind sowohl die Schwesterchromatide als auch homologe Chromosomen als Matrize geeignet (Johnson und Jasin, 2001). In Säugerzellen ist die homologe Schwesterchromatide das bevorzugte Substrat für die DSB-Reparatur (Moynahan et al., 1997; Richardson et al., 1998; Johnson und Jasin, 2000), weshalb die HR in der S- und G2-Phase aktiv ist. Hier stehen nach der DNA-Replikation Schwesterchromatiden zur Verfügung und eine fehlerfreie Reparatur ist möglich. In der G1-Phase wird die HR unterdrückt um zu verhindern, dass das homologe Chromosom als Matrize verwendet wird. Dies kann aufgrund ausgedehnter repetitiver Bereiche (Kim et al., 1998; Li et al., 2001) zu

2. Einleitung

genomischen Rearrangements führen (Fasullo et al., 1998; Richardson und Jasin, 2000; Argueso et al., 2008; Pannunzio et al., 2008).

Der erste Schritt der HR besteht in der Resektion der 5'-Bruchenden, um überhängende 3'-Enden zu erzeugen. Für diesen Schritt ist der MRN-Komplex in Zusammenarbeit mit CtIP (*CtBP-Interacting Protein*) zuständig (Sartori et al., 2007). CtIP interagiert direkt mit MRN und stimuliert dessen Endonukleaseaktivität. Auch Studien in der Hefe zeigen, dass der MRX-Komplex (Homologe von MRN in Mensch) an der Anresection der Bruchenden über ein kurzes DNA-Stück (50 - 100 Nukleotiden) beteiligt ist. Zur weiteren Resektion der Bruchenden über einen größeren DNA-Bereich von vermutlich über 1 kbp (Sun et al., 1991; White und Haber, 1990; Cao et al., 1990) werden zusätzlich Exonukleasen wie Exo1 und/oder DNA2 benötigt (Bernstein und Rothstein, 2009). Exo1 verfügt im Gegensatz zum MRN-Komplex über eine 5'-3'-Exonukleaseaktivität, die für die Resektion der Bruchenden benötigt wird (Nimonkar et al., 2008).

Die einzelsträngigen 3'-Überhänge werden zunächst von RPA (*Replikation Protein A*) gebunden, um die DNA-Enden vor nukleolytischen Angriffen zu schützen und die Ausbildung von sekundären Strukturen zu verhindern (Williams et al., 2007; Sugiyama et al., 1997). RPA wird durch Rad51 ersetzt und es bildet sich ein Rad51-Nukleoproteinfilament aus, das die Stranginvasion in das unbeschädigte DNA-Molekül koordiniert. An diesem Schritt ist BRCA2 beteiligt. Homologe DNA-Bereiche werden gesucht und es entsteht eine Holliday-Struktur (Holliday, 1964). Bei diesem Vorgang sind zusätzliche Proteine wie RPA, Rad52 (Mortensen et al., 1996; Van Dyck et al., 1998; Hiom, 1999) und Rad54 (Petukhova et al., 1998; Mazin et al., 2000) notwendig. Rad54 tritt mit Rad51 in Wechselwirkung (Clever et al., 1997; Jiang et al., 1996) und unterstützt vermutlich auch den Aufbau des Nukleoproteinfilaments, sowie die spätere Strangaustauschreaktion (Tan et al., 2003; West, 2003). Es wird diskutiert, dass Rad54 durch Topologieänderung der DNA-Helix diese partiell entwindet, wodurch das Rad51-Nukleoproteinfilament leichter in die intakte DNA-Helix einwandern kann (Ristic et al., 2001).

Nachdem die homologen Abschnitte gefunden sind, kommt es zur Basenpaarung zwischen dem gebrochenen und dem intakten Strang. Das 3'-Ende des gebrochenen Strangs in der basengepaarten Heteroduplexregion wird durch eine DNA-Polymerase verlängert und durch die DNA-Ligase1 ligiert, wobei der intakte Strang als Matrize dient. Nach der DNA-Synthese wird die Holliday-Struktur prozessiert und entfernt, vermutlich durch das Zusammenspiel von Helikasen (BLM, WRN) und Nukleasen (Mus81/Eme1) (Iijima et al., 2008). Es kommt zur

2. Einleitung

Entstehung von zwei intakten Strängen (Modesti und Kanaar, 2001). Dabei kann es zu Genkonversion mit oder ohne Crossing over kommen (Szostak et al., 1983) (Abb. 2.7. rechts). Zusätzliche HR-Proteine wie BRCA1, BRCA2 (Modesti und Kannar, 2001) und Rad51-Paralogue (XRCC2, XRCC3, Rad51B, Rad51C, Rad51D) (Albala et al., 1997; Liu et al., 1998; Pittman et al., 1998; Tambini et al., 1997; Cartwright et al., 1998a/b) sind an der Stranginvasion des Rad51-Nukleoproteinfilaments beteiligt. BRCA1 und BRCA2 sind für die HR essentiell. Mutationen in beiden Proteinen führen zu einer Verminderung der HR-Rate.

Die Auswirkungen von Mutationen in HR-Faktoren bei Säugern hängen von der Bedeutung der betroffenen Proteine ab. Während die Inaktivierung von Rad52 keine Auswirkung zeigt (Rijkers et al., 1998; Yamaguchi-Iwai et al., 1998), ist die Inaktivierung von Rad54 mit einer leichten Erhöhung der Strahlenempfindlichkeit assoziiert (Takata et al., 1998; Essers et al., 2000; Essers et al., 1997; Bezzubova et al., 1997). Die Mutation von Rad51 ist letal (Lim et al., 1996; Sonoda et al., 1998). Die Inaktivierung von XRCC2 und XRCC3 verursacht bei den Zellen eine deutliche Strahlenempfindlichkeit (Liu et al., 1998; Takata et al., 2001). Zusätzlich zeigen XRCC2- und XRCC3-defiziente Hamsterzellen eine erhöhte Rate an spontanen und strahleninduzierten Chromosomenaberrationen (Liu et al., 1998; Tebbs et al., 1995). Außerdem zeigen Patienten mit heterozygoten Mutationen in BRCA1 und BRCA2 eine erhöhte Prädisposition für Brustkrebs und Eierstockkrebs (Antoniou et al., 2003; King et al., 2003).

2. Einleitung

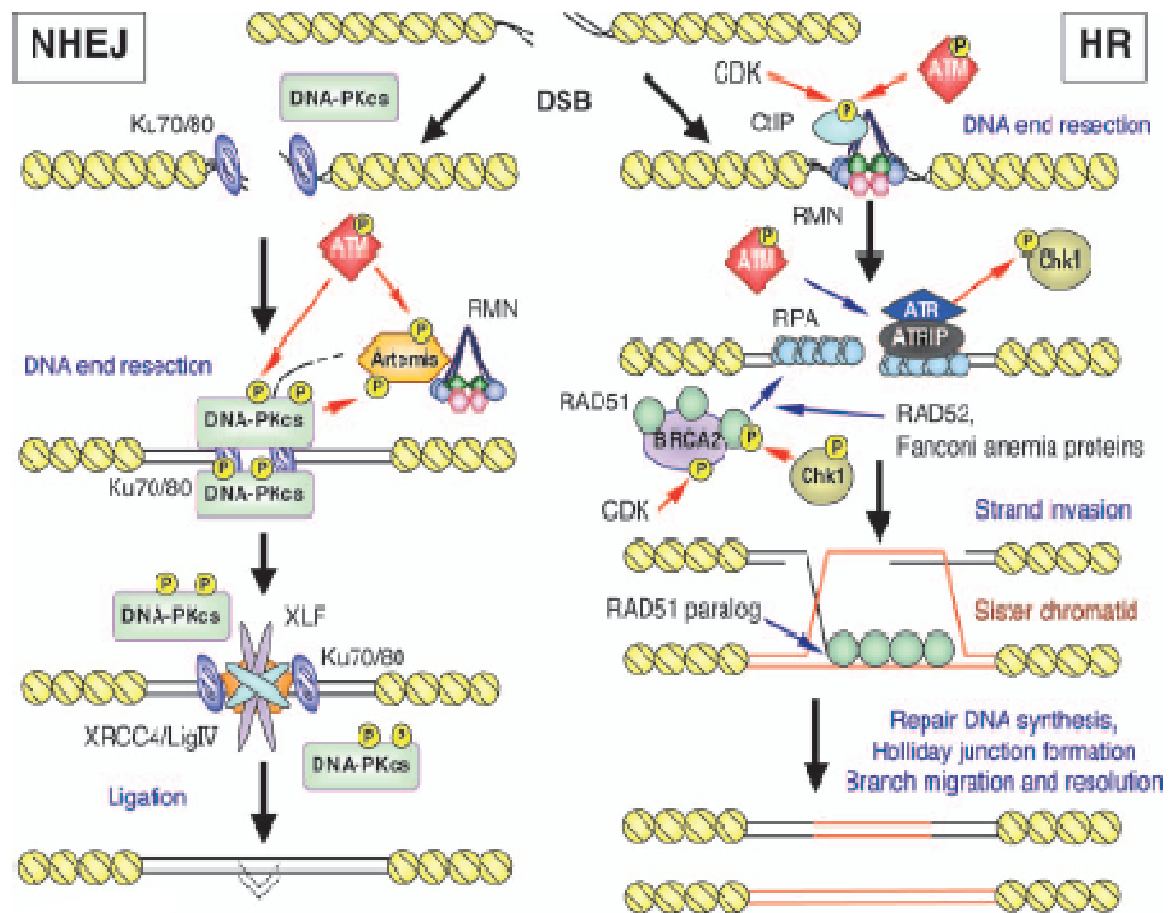


Abb. 2.7. DSB-Reparatur in Säugerzellen (Nach Iijima et al., 2008). DSBs werden entweder durch NHEJ oder HR beseitigt. Beim NHEJ bindet das Ku70/80-Heterodimer an den DNA-Enden und schützt sie vor Abbau durch Exonucleasen. Das Ku70/80-Heterodimer interagiert mit der DNA-PKcs und verursacht deren Aktivierung. Aktivierte DNA-PKcs phosphoryliert eine Reihe an Proteinen, darunter die Endonuklease Artemis. Artemis und/oder der MRN-Komplex (bestehend aus den Proteinen Mre11, Rad50 und NBS1) (RMN in der Abb.) sind wahrscheinlich an der Prozessierung von DNA-Enden mit komplexen Endstrukturen beteiligt. Der MRN-Komplex erleichtert das Zusammenhalten von Bruchenden. Die Autophosphorylierung von DNA-PKcs bewirkt deren Entfernung von der DNA und macht die DNA-Enden zugänglich für die Ligation durch den Ligase4/XRCC4/XLF-Komplex. Der initiale Schritt der HR ist die Resektion von 5'-Bruchenden, so dass überhängende 3'-Enden entstehen. An diesem Schritt sind wahrscheinlich der MRN-Komplex, CtIP und Exonuklease 1 beteiligt. RPA bindet an den 3'-Überhang und wird danach von Rad51 verdrängt. An diesem Schritt ist BRCA2 beteiligt. Die Positionierung von Rad51 durch BRCA2 ist durch CDK und Chk1 reguliert. Rad51 polymerisiert am Einzelstrang und bildet mit der DNA und mit Hilfe von RPA und Rad52 ein Nukleoproteinfilament. Andere Proteine wie BRCA1, BRCA2, die Rad51-Paraloga und die Fanconi anemia-Proteine sind an der Ausbildung des Rad51-Nukleoproteinfilaments beteiligt. Dieser dringt auf der Suche nach homologen Bereichen in die unbeschädigte Schwesterchromatid ein. Es bildet sich mit Hilfe von Rad52 (und Rad54) ein Heteroduplex aus der beschädigten und unbeschädigten DNA. Die beschädigte DNA wird durch DNA-Polymerase synthetisiert. Anschließend werden die Bruchenden ligiert und die entstandene Rekombinationsstruktur (Holliday-Struktur) wird prozessiert und mit Hilfe von verschiedenen Helikasen, Endonukleasen oder Resolvasen aufgelöst.

2. Einleitung

2.3.3. Das Single Strand Annealing (SSR)

Eine Sonderform der HR ist das sogenannte *Single Strand Annealing*. Doppelstrangbrüche, die zwischen zwei sich wiederholenden DNA-Sequenzen auftreten, können über diesen Weg repariert werden (Lin et al., 1984; Paques und Haber, 1999). Diese Art der Reparatur wurde für Doppelstrangbrüche beobachtet, die durch Restriktionsenzyme verursacht wurden (Sugawara und Haber, 1992). Unklar ist, ob über diesen Prozess auch strahleninduzierte Doppelstrangbrüche repariert werden können, deren Endstrukturen in der Regel wesentlich komplexer sind. Im Gegensatz zur homologen Rekombination erfordert dieser Reparaturweg kein homologes Chromosom oder eine Schwesterchromatide als Matrize, da die Reparatur direkt auf dem geschädigten DNA-Strang erfolgt. Im Zuge der Reparatur geht die zwischen den homologen Bereichen liegende Sequenzinformation ebenso verloren wie eine Kopie der homologen Abschnitte. Dieser Weg ist Rad51-unabhängig, benötigt aber Rad52 und Rad59 (David und Symington, 2001; Fishman-Lobell et al., 1992).

Die am SSA beteiligten Faktoren sind in *Saccharomyces cerevisiae* beschrieben. Rad52 bindet unabhängig von anderen Proteinen der Rad52-Epistasis Gruppe wie Rad51 und Rad54 an die Bruchenden (Ivanov et al., 1996). Die Enden des Doppelstrangbruchs werden zunächst exonukleolytisch angegriffen, wobei überhängende 3'-Enden entstehen. Die Resektion der 5'-Enden geschieht mit hoher Wahrscheinlichkeit über den Rad50/Xrs2/Mre11-Komplex (Pastink et al., 2001), dessen Fehlen SSA zwar nicht unmöglich macht, aber die Rate signifikant reduziert (Ivanov et al., 1996). Die dadurch hervorgerufenen einzelsträngigen DNA-Bereiche gleiten anschließend mit Hilfe von Rad52 so lange aneinander vorbei, bis eine Homologie von 60-90 Nukleotiden auftritt, an der die Basenpaarung über Wasserstoffbrückenbildung stattfinden kann (Mortensen et al., 1996; Shinohara et al., 1998). An dieser Position bildet sich ein doppelsträngiger DNA-Abschnitt aus. Die nicht gebundenen Einzelstrangenden können durch Rad1 und Rad10 entfernt werden (Fishman-Lobell und Haber, 1992). Die einzelsträngigen DNA-Lücken können neu synthetisiert und anschließend ligiert werden.

Die SSA verläuft bei Säugerzellen vermutlich identisch. Es konnte gezeigt werden, dass humanes Rad52 *in vitro* an DNA bindet (Van Dyck et al., 1999). Allerdings war die DNA-Bindungsaffinität von Rad52 bei ssDNA höher als bei dsDNA (Benson et al., 1998; VanDyck et al., 1998; Van Dyck et al., 1999). Dagegen bindet ScRad52 (aus *Saccharomyces cerevisiae*) nur an doppelsträngige DNA-Enden. Vermutlich ist auch der MRN-Komplex an der Resektion der 5' DNA-Enden beteiligt (Kanaar et al., 1998). Die Entfernung von

2. Einleitung

einzelsträngigen DNA-Überhängen geschieht durch die Homologe von Rad1 und Rad10, den XPF/ERCC1 Komplex (Karran et al., 2000; Pastink et al., 2001). Eine schematische Darstellung des SSA ist in Abbildung 2.8. wiedergegeben.

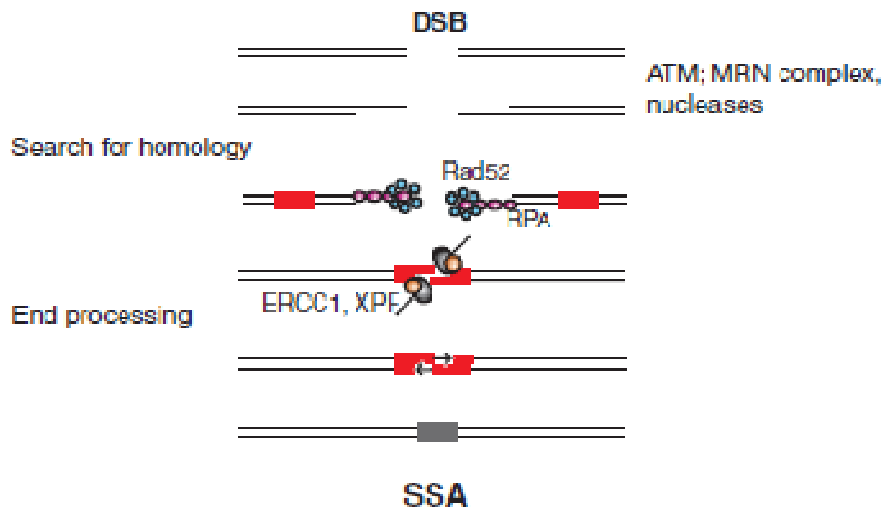


Abb 2.8. Modell des Single Strang Annealing in Säugerzellen (aus Kinner et al., 2008). Die markierten Bereiche stellen homologe DNA-Sequenzen dar. Nach der Erkennung des DSBs und der Prozessierung der Bruchenden, vermutlich durch den MRN Komplex und weitere Nukleasen, entstehen einzelsträngige DNA-Überhänge, an denen RPA bindet. Als nächster Schritt erfolgt die Resektion der DNA-Enden, bis die homologen Bereiche zugänglich werden. Die Paarung der homologen Bereiche auf beiden DNA-Stränge erfolgt mit Hilfe von Rad52. Die fehlenden Basen werden durch Polymerasen neu synthetisiert und die DNA-Überhänge von der ERCC1/XPF- Endonuklease entfernt. Anschließend erfolgt die Ligation der DNA-Enden.

2.4. Klinische und zelluläre Auswirkungen von Defekten der DNA-Schadenserkennung und -Reparatur

Die Ursache zahlreicher Krankheiten liegt in erblichen Defekten bestimmter Gene, deren Funktion es ist, unser Genom vor Schäden zu schützen, Schäden zu erkennen und zu reparieren. Betroffene Patienten weisen häufig ein erhöhtes Krebsrisiko auf und sind aufgrund einer eingeschränkten DNA-Reparatur strahlenempfindlich.

2.4.1. Ataxia-telangiectasia (AT) und ATM

Der genetische Hintergrund der Erkrankung ist durch Mutation des AT-Gens gekennzeichnet. Das Genprodukt ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*) gehört zur Familie der Phosphatidylinositol-3-OH-Kinase-ähnlichen-Kinasen (Abraham, 2001). ATM wird durch DSBs aktiviert, die während der Replikation und nach Behandlung durch ionisierende Strahlung bzw. Chemotherapeutika entstehen (Lee und Paull, 2007).

2. Einleitung

Menschen mit dieser Erkrankung zeigen eine extreme Strahlensensitivität mit schwersten Nebenwirkungen schon nach der Einwirkung von geringen Dosen. Immundefizienz, ovarielle Dysgenese, Entwicklungsretardierung, progressive zerebellare Ataxie und Teleangiectasien gehören zu den klinischen Merkmalen dieser Krankheit (Shiloh, 2003). Zu den zellulären Merkmalen gehören starke Strahlenempfindlichkeit (Xu et al., 2006; Xu und Baltimore, 1996), chromosomale Instabilität, radioresistente DNA-Synthese (RDS) und Zellzyklus-Defekte, da ATM eine Reihe von Proteinen phosphoryliert, die an der Zellzykluskontrolle beteiligt sind (Iliakis et al., 2003). ATM-defiziente Zellen weisen außerdem einen kleinen aber signifikanten DSB-Reparaturdefekt gegenüber WT-Zellen auf. In der G1- und G2-Phase verbleiben etwa 10-15 % ihrer DSBs unrepariert (Riballo et al., 2004; Beucher et al., 2009). Weitere an der DSB-Reparatur beteiligte Proteine wie DNA-PKcs (Chen et al., 2007) und H2AX (Burna et al., 2001; Stiff et al., 2004) werden auch von ATM phosphoryliert.

2.4.2. Severe Combined Immunodeficiency (SCID) und DNA-PKcs

Diese Erkrankung ist auf einen Defekt der DNA-PKcs zurückzuführen. Auf zellulärer Ebene ist eine stark verminderte Doppelstrangbruchreparatur zu beobachten. Dies resultiert in der Unfähigkeit der Zelle, die DSB-Intermediate in der V(D)J-Rekombination zusammenzuführen und führt so zur Immundefizienz (Gao et al., 1998; Tacciolo et al., 1998; Jhappan et al., 1997). DNA-PKcs bildet zusammen mit Ku70 und Ku80 den DNA-PK-Komplex. In höheren Eukaryonten führen Defizienzen in einem der drei Komponenten von DNA-PK zu einem starken DSB-Reparaturdefekt. Infolgedessen tritt eine starke Strahlensensitivität auf. Diese Strahlenempfindlichkeit ist nicht zwingend letal. Jedoch hat ein DNA-PK-Defekt nach der Geburt fatale Auswirkungen, da das Immunsystem von Säugern vom NHEJ abhängt, um den V(D)J-Rekombinationsprozess abzuschließen. Die V(D)J-Rekombination übernimmt eine wichtige Funktion bei der Antikörperherstellung und -vielfalt.

2.4.3. Ligase4-Syndrom

Patienten, die an Lig4-Syndrom erkrankt sind, weisen klinische Merkmale wie Mikrozephalie, Entwicklungsretardierung sowie Panzytopenie (starke Verminderung der Blutzellen aller Systeme) auf. Zudem liegt eine starke Strahlensensitivität vor (Riballo et al., 1999). Der Totalverlust von DNA-Ligase4 ist embryonal letal (Lee et al., 2000b). Mutationen, die dem menschlichen Ligase4-Syndrom zugrunde liegen, sind hypomorph, d.h. es ist immer noch eine Restaktivität des Proteins vorhanden. Ligase4-defiziente Zellen sind strahlenempfindlich und weisen eine stark verminderte DSB-Reparatur auf. Im Gegensatz zu

2. Einleitung

ATM-defizienten Zelllinien weisen sie keinen Defekt in der Zellzykluskontrolle auf (O'Driscoll et al., 2001).

2.4.4. XRCC4 Like Factor (XLF)/Cernunnos

2003 wurden Zellen eines Patienten isoliert, welche eine erhöhte Strahlenempfindlichkeit, stark verminderte DSB-Reparatureffizienz und Defekte der V(D)J-Rekombination aufwiesen (Dai et al., 2003). Diese Zellen zeigten keine erkennbaren Mutationen in klassischen NHEJ-Proteinen wie Ku70, Ku80, XRCC4, DNA-Ligase4. Außerdem konnten keine Defekte in den Komponenten des MRN-Komplexes festgestellt werden. Dies sprach für die Beteiligung eines weiteren Proteins am NHEJ und der V(D)J-Rekombination. Dieses Protein wurde zeitgleich von zwei unabhängigen Labors identifiziert und XLF/Cernunnos benannt (Buck et al., 2006; Ahnesorg et al., 2006). XLF/Cernunnos interagiert mit Ligase4 und ist Teil des DNA-Ligase4/XRCC4-Ligationskomplexes. XLF- und Ligase4-Patienten zeigen ähnliche klinische und zelluläre Merkmale (Buck et al., 2006; Ben-Omran et al., 2005). Dies schließt Mikrozephalie und Immundefizienz ein, hauptsächlich charakterisiert durch eine stark beeinträchtigte Entwicklung von B- und T-Lymphozyten.

2.4.5. Radiation Sensitive Severe Combined Immunodeficiency (RD SCID) und Artemis

Auch Menschen mit einem defekten Artemis-Gen zeigen einen Defekt des Immunsystems, da Artemis eine Rolle bei der V(D)J-Rekombination spielt. Artemis ist verantwortlich für die Auflösung von Haarnadelstrukturen, die bei diesem Prozess entstehen. Artemis-defiziente Zelllinien weisen allerdings nur einen schwachen DSB-Reparaturdefekt auf und unterscheiden sich damit von Zelllinien mit einem Defekt in der DNA-PKcs oder anderen Kernkomponenten des NHEJ. Dies mag daran liegen, dass Artemis nur für das Prozessieren und die Reparatur von einer Subpopulation an DSBs notwendig ist (Ma et al., 2002; Riballo et al., 2004). Bei dieser Subpopulation handelt es sich womöglich um Brüche mit komplizierten Bruchstrukturen, die aufgrund von modifizierten Bruchenden nicht direkt ligiert werden können. Sie müssen zuerst prozessiert werden. Bei diesem Prozess könnte die Nukleaseaktivität von Artemis gebraucht werden. Artemis und ATM-defiziente Fibroblasten weisen eine ähnliche Strahlensensitivität und einen Reparaturdefekt von ähnlichem Ausmaß auf. Dies führte zu der Vermutung, dass beide Proteine am gleichen Reparaturweg beteiligt sind. Dies konnte in der G0-Phase bestätigt werden (Riballo et al., 2004).

2.4.6. Hereditäres Mammakarzinom (BRCA1/BRCA2)

Bei 10-15 % der erblich bedingten Brustkrebsfälle sind die Produkte der BRCA1/BRCA2 Gene mutiert (Übersicht in Venkitaraman, 2002). In BRCA1/BRCA2-defizienten Zellen ist

2. Einleitung

die Doppelstrangbruchreparatur vermindert (Moynahan et al., 1999; Moynahan et al., 2001; Tutt et al., 2001). In der Abwesenheit von funktionellem BRCA1 und BRCA2 kann keine HR durchgeführt werden. BRCA1/BRCA2-defiziente Zellen zeigen außerdem eine genomische Instabilität und sind empfindlich gegenüber DNA-schädigende Agenzien (Moynahan et al., 1999).

BRCA2 ist an der HR beteiligt und bindet direkt an Rad51 (Sharan et al., 1997; Wong et al., 1997). Es agiert vermutlich als Hilfsfaktor bei der Bildung des Rad51-Nukleoproteinfilaments (Davies et al., 2001). BRCA1 ist der Hauptbestandteil des BRCA1-assoziierten Genom-Überwachungskomplex (*BRCA1-associated genome surveillance complex, BASC*), der unter anderem ATM, Rad50 und BLM umfasst. Dieser Komplex wirkt als DSB-Sensor (Wang et al., 2000). Nach Erkennung des DSBs wird BRCA1 von ATM und ATR phosphoryliert (Tibbetts et al., 2000) und initiiert die DSB-Reparatur durch HR (Zhong et al., 1999). BRCA1 ist verantwortlich für die Lokalisierung von Rad51 an die Bruchstelle. So werden in BRCA1-defizienten Zellen keine Rad51-Foci ausgebildet (Bhattacharyya et al., 2000; Drew und Calvert, 2008).

2.5. Nachweis von DNA-Doppelstrangbrüchen

DNA-Doppelstrangbrüche können durch eine Reihe von Methoden nachgewiesen werden. Dazu gehören die Immunfluoreszenzmikroskopie (insbesondere die γ H2AX-Immunfluoreszenzmikroskopie), der neutrale Comet-Assay (Fairbairn et al., 1995), die Pulsfeldgelelektrophorese (Whitaker et al., 1991) und chromosomale Studien. Die Immunfluoreszenzmikroskopie zeichnet sich durch eine hohe Sensitivität auch bei niedrigen Dosen aus. Beim neutralen Comet-Assay beträgt die minimale Strahlungs-dosis ca. 4 Gy (Lobrich und Kiefer, 2006). Diese Strahlungs-dosis induziert ca. 160 DSBs in einer Zelle (Friedberg et al., 2006). Bei der Pulsfeldgelelektrophorese werden Dosen von über 20 Gy benötigt. Die beschriebenen Nachweismethoden eignen sich allerdings nur zur Untersuchung des zeitlichen Verlaufs der DSB-Reparatur. Eine Aussage über die Qualität der Reparatur ist nicht immer möglich. Im Rahmen dieser Arbeit wurde hauptsächlich die Immunfluoreszenzmikroskopie zur Detektion von DSBs angewendet.

2.5.1. Immunfluoreszenzmikroskopie

Eine der ersten Reaktionen einer Säugerzelle auf das Auftreten eines DSBs ist die Phosphorylierung des Histons H2AX am Serinrest 139 zum sogenannten γ H2AX in der

2. Einleitung

unmittelbaren Umgebung des Bruches (Rogakou et al., 1999; Pilch et al., 2003). H2AX ist eine Isoform des Histons H2A und liegt in etwa 10 % der H2A-Population innerhalb des Chromatins vor (Mannironi et al., 1989). Die Phosphorylierung erfolgt zunächst nah an der Bruchstelle und breitet sich aus, so dass H2AX bis zu einer Entfernung von mehreren Megabasen um den DSBs phosphoryliert wird (Rogakou et al., 1999). Mit Hilfe spezifischer Antikörper können die modifizierten γ H2AX-Moleküle bereits wenige Minuten nach Bestrahlung nachgewiesen werden und im Mikroskop als punktförmige Strukturen, sogenannte nukleäre Foci (Abb. 2.9.) sichtbar gemacht werden (Rogakou et al., 1999). Die Funktion der umfangreichen Phosphorylierung von H2AX ist bisher nicht abschließend geklärt. γ H2AX unterstützt vermutlich die Rekrutierung von Reparaturproteinen an den Ort des DSBs und hält diese dort fest (Celeste et al., 2003).

Neben γ H2AX bilden auch andere Reparaturproteine und Proteine, die den Zellzyklus als Checkpointproteine regulieren, als nukleäre Foci nachweisbare Proteinansammlungen (Fernandes-Capetillo et al., 2004). Während Komponenten der HR wie Rad51 oder RPA nukleäre Foci ausbilden, konnte dies für klassische NHEJ-Proteine bisher nicht gezeigt werden. Dies könnte an der zu geringen Anzahl an NHEJ-spezifischen Molekülen am Ort des DSBs liegen, so dass diese immunfluoreszenzmikroskopisch nicht nachweisbar sind. Eine Ausnahme stellt allerdings die DNA-PKcs dar, die unter Replikationsstress Foci ausbilden kann, die sogar mit γ H2AX-Foci kolokalisieren (Schwartz et al., 2005).

Es konnte gezeigt werden, dass die Anzahl an γ H2AX-Signalen nach der Bestrahlung mit der Anzahl an DSBs korreliert (Rothkamm und Löbrich, 2003). Die Abnahme der γ H2AX-Foci mit zunehmender Inkubationszeit ist auf einsetzende Reparaturprozesse zurückzuführen (Abb. 2.9.). Durch Quantifizierung der γ H2AX-Foci kann eine Aussage über Anzahl an induzierten DSBs sowie über den Verlauf der DSB-Reparatur gemacht werden. Die γ H2AX-Immunfluoreszenzmikroskopie ist ein sehr sensitives Verfahren, das die Detektion der Entstehung und Reparatur von DSBs auch nach sehr geringen Dosen (bis wenige mGy) ermöglicht (Löbrich et al., 2006; Rübe et al., 2007; Kuefner et al., 2009; Grudzenski et al., 2009). Die Auswertung kann durch Auszählen der Foci (Taneja et al., 2004; Deckbar et al., 2007; Beucher et al., 2009), durch FACS-Analyse (Olive et al., 2003; Banath et al., 2004) oder Messung der Fluoreszenzintensitäten von Einzelbildern erfolgen (Mahrhofer et al., 2006; Mirzahans et al., 2006). Im Rahmen dieser Arbeit wurde hauptsächlich die γ H2AX-Immunfluoreszenzmikroskopie angewendet, um Entstehung und Reparatur von DNA-DSBs nach Einwirkung ionisierender Strahlung zu untersuchen.

2. Einleitung

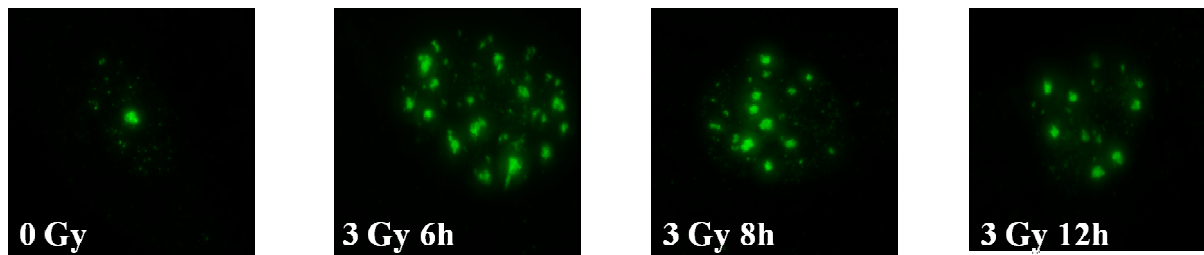


Abb. 2.9. Repräsentative γ H2AX-immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Zellkerne von einer untersuchten Zelllinie (HSF-1) nach einer Bestrahlung mit 3 Gy (von AG Löbrich, Homburg/Saar). Links unten sind die Reparaturzeiten angegeben, d.h. die Zeiten zwischen der Bestrahlung und der Fixierung der Zellen. Deutlich sichtbar ist die reparaturbedingte Abnahme der γ H2AX-Foci nach längerer Inkubationszeit. Als Kontrolle ist eine unbestrahlte Zelle dargestellt, die kaum γ H2AX-Foci enthält.

2.6. Ziel der Arbeit

2.6.1. Welchen Anteil übernehmen ATM und Artemis in der Reparatur von DNA-DSBs in der G1- und G2-Phase?

An konfluenten Zellen (G0-Zellen) durchgeführte Reparaturstudien haben gezeigt, dass ATM und Artemis für die Reparatur von ca. 10 % der strahleninduzierten Brüche essentiell sind. Diese Schäden verbleiben in ATM- und Artemis-defizienten Zellen auch lange Zeiten nach Schadensinduktion unrepariert (Riballo et al., 2004). Es wurde postuliert, dass es sich dabei um komplexe DSBs mit möglicherweise modifizierten Bruchenden handelt, die vor der Ligation zunächst von der Endonuklease Artemis prozessiert werden müssen. Studien haben gezeigt, dass Artemis von ATM *in vitro* phosphoryliert wird (Chen et al., 2005; Riballo et al., 2004; Zhang et al., 2004). Weitere Ergebnisse untermauern die Rolle von ATM und Artemis in der Reparatur solcher komplexen DSBs. Zum einen wurden in unserem Labor Experimente durchgeführt, die gezeigt haben, dass ATM- und Artemis-defizienten Zelllinien nach Bestrahlung mit α -Teilchen ca. 25-30 % der DSBs unrepariert lassen (Martin Kühne, Doktorarbeit). Die Bestrahlung mit α -Teilchen induziert im Vergleich zu Röntgenstrahlung mehr komplexe DSBs, für deren Reparatur ATM und Artemis benötigt werden. Dagegen verläuft die Reparatur von etoposid-induzierten DSBs in ATM- und Artemis-defizienten Zelllinien ähnlich wie in WT-Zellen (Riballo et al., 2004). Etoposid ist eine Topoisomerase II-Inhibitor, der einheitliche DSBs mit einfacher Bruchstruktur induziert. Diese DNA-Schäden erfordern keine Beteiligung von ATM und Artemis an der Reparatur. Allerdings lassen sich Daten von G0-Zellen nicht ohne weiteres auf G1-Zellen übertragen, da G1-Zellen im Gegensatz zu G0-Zellen in der nächsten Zellzyklusphase übergehen können. Somit können die zellulären Vorgänge in beiden Zellzyklusphasen unterschiedlich ablaufen. Außerdem ist

2. Einleitung

in G2- und S-Zellen mit der homologen Rekombination ein weiterer DSB-Reparaturweg verfügbar. Gibt es einen Unterschied im Reparaturverhalten zwischen konfluenten (G0-) und proliferierenden G1-Zellen? Wie verläuft die Reparatur strahleninduzierter DSBs in der G2-Phase? Um diese Fragen zu beantworten wurde das Reparaturverhalten von proliferierenden ATM- und Artemis-defizienten Zellen in der G1- und G2-Phase untersucht.

2.6.2. Welchen Anteil haben das NHEJ und die HR in der Reparatur von DNA-DSBs in der G2-Phase des Zellzyklus?

NHEJ ist der dominierende Reparaturweg in der G1-Phase des Zellzyklus. NHEJ-Mutanten zeigen einen sehr starken Reparaturdefekt in der G0-Phase und sind sehr strahlenempfindlich. In der G2-Phase steht neben dem NHEJ auch die HR als alternativer Reparaturmechanismus zur Verfügung. HR-Mutanten zeigen eine erhöhte Prädisposition zur Tumorbildung, was eine wichtige Rolle der HR in der DSB-Reparatur vermuten lässt. Wie verläuft die DSB-Reparatur von NHEJ-Mutanten in der G1-Phase in Abwesenheit des Hauptreparaturwegs? Wie verläuft die DSB-Reparatur von NHEJ-Mutanten in Anwesenheit der HR in der G2-Phase? ATM und Artemis werden in G0 dem NHEJ zugeordnet. Wie ändert sich das Reparaturverhalten von den klassischen NHEJ-Mutanten im Vergleich zu ATM- und Artemis-Mutanten in der G1- und G2-Phase? Um diese Fragen zu beantworten sollte das Reparaturverhalten von NHEJ- und HR-defizienten Zellen in der G1- und G2-Phase untersucht werden.

Außerdem soll der Effekt von Störungen in beiden Hauptreparaturwegen untersucht werden. Können Zellen mit Defizienzen in NHEJ und HR überhaupt DSBs entfernen? Gibt es Mechanismen, die die DSB-Reparatur in diesem Fall übernehmen? Um Aussage darüber zu treffen soll das DSB-Reparaturverhalten verschiedener NHEJ/HR-Doppelmutanten in der G1- und G2-Phase analysiert werden.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Geräte und Verbrauchsmaterial

| | |
|---|--|
| Autoklav | Sterilisator Mod. FVA |
| Brutschränke mit CO ₂ - Begasung | Binder CB/50, Heraeus B5061EK, Jouan IG150 |
| Deckgläschen | Carl Roth |
| Durchflusszytometer | Becton Dickinson FACScan TM |
| Einfrierröhrchen | CryoTube TM Vials |
| Feinwaage | Sartorius analytic A210P |
| Fluoreszenzmikroskope | Zeiss Axioplan2, Zeiss Axioskop, Zeiss Axiovert |
| Freezing Container (Kryotank) | |
| Kühlzentrifugen | Eppendorf 5840R |
| Lichtmikroskop | Nikon Eclipse TS100 |
| Mikroskop-Kamerasystem | Zeiss AxioCam MRm |
| Millipore Anlage | TKA-DI 2000 |
| Neubauer- Zählkammer | Carl Roth |
| Objektträger | Menzel-Gläser Superfrost ^R |
| Schüttler | Fröbel GmbH RT45 |
| Sterilwerkbänke | Napco NapFlow, Holten LaminAir |
| Röntgenröhre | Philips MCN 165/796704 |
| Tischzentrifuge | Eppendorf 5415C |
| Vakuumpumpe | Haep HLC Sicherheitsabsaug- system AZ |
| Vortex | Scientific Industries Vortex-Genie2 |
| Wasserbad | Memmert GmbH und Co.KG WB/OB45 |
| Zellkulturflaschen | TPP, 25 cm ² und 75 cm ² |

3. Material und Methoden

Zellkulturschalen Nunc 8,8 cm² und 21,5 cm²

Zentrifugenröhrchen TPP, 15 ml und 50 ml

3.1.2. Medien, Puffer und Chemikalien

Aceton Roth

Aphidicolin Sigma, 1 mg/ml DMSO

ATM Inhibitor (Ku-0055933) KuDOS Pharmaceuticals Ltd

BrdU BD PharmingenTM, 1 mM in PBS

BSA Roth, Albumin Fraktion V

DAPI Sigma, 1 mg/ml in PBS

Dimethylsulfoxid (DMSO) Roth, Rotipuran^R

DMEM Biochrom

DNase Fluka, 1 mg/ml in 50 % Glycerin +
0,15 M NaCl

DNA-PK Inhibitor (Ku-0051777) KuDOS Pharmaceuticals Ltd

Ethanol, vergällt zentrales Chemikalienlager der
Universität des Saarlandes,
Vergällt mit 1 % MEK

FCS Biochrom

Formaldehyd Roth, 37 %

HAM'S 10 Biochrom

HCl Roth, Rotipuran^R

MEM Biochrom

Methanol Roth, Rotipuran^R

Mounting Medium Vector Laboratories, Vectashield^R

10 x PBS Puffer Instamed-pulver, Biochrom

Penicillin/Streptomycin Biochrom

Triton-X100 Roth

Trypsin Biochrom

3. Material und Methoden

3.1.3. Eingesetzte Lösungen

| | |
|---------------------|--|
| Einfriermedium | 20 % (v/v) Zellkulturmedium |
| | 20 % (v/v) DMSO |
| | 60 % (v/v) FCS |
| Trypsin-EDTA Lösung | 0,1 % Trypsin |
| | 0,5 mM Na ₂ -EDTA pH 8 in PBS |
| Propiumiodid Lösung | 50 µg/ml Propiumiodid |
| | 0,5 mg/ml RNase in PBS |

3.1.4. Antikörper

3.1.4.1. Primäre Antikörper

| | |
|-----------------------------------|---|
| Mouse anti-phosphoH2AX (Ser139) | Upstate, IgG, 1 µg/µl |
| Rabbit anti-phosphoH2AX (Ser139) | Upstate, IgG, 1 µg/µl |
| Mouse anti-BrdU (enthält DNase) | fertige Gebrauchslösung aus 5-Bromo-2'-deoxyuridine Labeling & Detectionkit I (IgG1, Roche) |
| Sheep anti-BrdU | USBiological, IgG2b, 1 mg/ml |
| Mouse anti-BrdU | BD Pharmingen, fertige Gebrauchslösung aus „FITC conjugated mouse monoclonal Antibodyset“, IgG1 |
| Rabbit anti-CENP-F (H-260) | Santa Cruz , IgG, 200 µg/ml |
| Rabbit anti-phosphoH3 (Ser10) | Upstate, IgG, 1 µg/µl |
| Rabbit anti-RAD51 (Ab-1) | Calbiochem, IgG, 1 µg/µl |
| Rabbit anti-phospho ATM (Ser1981) | Rockland, 0,95 µg/µl |
| Rabbit anti-cyclin A (H-432) | Santa Cruz, IgG, 0,2 µg/µl |
| Rabbit anti-cyclin B1 (H-433) | Santa Cruz, IgG, 200 µg/ml |

3.1.4.2. Sekundäre Antikörper

| | |
|--------------------------------------|---------------------------|
| Goat anti-mouse IgG Alexa Fluor 488® | Molecular Probes, 2 µg/µl |
|--------------------------------------|---------------------------|

3. Material und Methoden

| | |
|---------------------------------------|---------------------------|
| Goat anti-rabbit IgG Alexa Fluor 488® | Molecular Probes, 2 µg/µl |
| Goat anti-mouse IgG Alexa Fluor 594® | Molecular Probes, 2 µg/µl |
| Goat anti-rabbit IgG Alexa Fluor 594® | Molecular Probes, 2 µg/µl |
| Goat anti-rabbit IgG Alexa Fluor 546® | Molecular Probes, 2 µg/µl |
| Donkey anti-sheep Alexa Fluor 594® | Molecular Probes, 2 µg/µl |

3.1.5. Oligonukleotide

siRNA ATM

Qiagen

Zielsequenz: CAC CTG TTT GTT AGT TTA TTA

Sense: r (CCU GUU UGU UAG UUU AUU A) dTdT

Antisense: r (UAA UAA ACU AAC AAA CAG G) dTdG

siRNA Artemis

Qiagen

Zielsequenz: AAC TGA AGA GAG CTA GAA CAG

Sense: r (CUG AAG AGA GCU AGA ACA G) dTdT

Antisense: r (CUG UUC UAG CUC UCU UCA G) dTdT

siRNA Ligase4

Qiagen

Zielsequenz: CAA GAT GTT TAC AGA AAG GAA

Sense: r (AGA UGU UUA CAG AAA GGA A) dTdT

Antisense: r (UUC CUU UCU GUA AAC AUC U) dTdG

siRNA RAD51

Qiagen

Zielsequenz: AAG GGA ATT AGT GAA GCC AAA

Sense: r (GGG AAU UAG UGA AGC CAA A) dTdT

Antisense: r (UUU GGC UUC ACU AAU UCC C) dTdT

siRNA Ku80

Qiagen

Zielsequenz: AAG ACA GAC ACC CTT GAA GAC

Sense: r (GAC AGA CAC CCU UGA AGA C) dTdT

Antisense: r (GUC UUC AAG GGU GUC UGU C) dTdT

siRNA Kontrolle

Qiagen

Zielsequenz: AAT TCT CCG AAC GTG TCA CGT

Sense: r (UUC UCC GAA CGU GUC ACG U) dTdT

3. Material und Methoden

Antisense: r (ACG UGA CAC GUU CGG AGA A) dTdT

3.1.6. Verwendete Zelllinien

3.1.6.1. Primäre Zelllinien

- HSF-1 (Human Skin Fibroblasts-1)

HSF-1 ist eine primäre Zelllinie von menschlichen Fibroblasten, die aus dem Hautbiopsiematerial eines gesunden Probanden stammt. Die HSF-1-Zellen wurden von Dr. H. Dittmann zur Verfügung gestellt. Kultiviert wurden die Zellen in *Minimum Essential Medium* (MEM) versetzt mit 10 % fötalem Kälberserum (FCS), 1 % *Non Essential Amino Acids* (NEAA), 0,1 mg/ml Streptomycin und 100 Units/ml Penicillin.

- MRC-5 (Medical Research Council-5)

MRC-5 ist eine primäre Zelllinie von embryonalen menschlichen Lungenfibroblasten, die von einem 14 Wochen alten männlichen Fötus stammen. MRC-5-Zellen wurden 1966 von J. P. Jacobs hergestellt und entwickelt (J.P. Jacobs et al., 1970). Sie wurden von der ECACC (Nummer 84101801) und der ATCC (Nummer CCL-171) bezogen. Kultiviert wurden die Zellen in MEM versetzt mit 10 % FCS, 1 % NEAA, 0,1 mg/ml Streptomycin und 100 Units/ml Penicillin.

- CJ179

CJ179 ist eine primäre Zelllinie von menschlichen Fibroblasten eines Patienten mit einem Defekt im Artemis-Gen. CJ179-Zellen wurden von Prof. Dr. P. Jeggo zur Verfügung gestellt. Kultiviert wurden die Zellen in MEM versetzt mit 20 % FCS, 1 % NEAA, 0,1 mg/ml Streptomycin und 100 Units/ml Penicillin.

- F01-240

F01-240 ist eine primäre Zelllinie von menschlichen Hautfibroblasten, die von einem Patient mit einem Defekt im Artemis-Gen stammen. F01-240-Zellen wurden von Prof. Dr. P. Jeggo zur Verfügung gestellt. Kultiviert wurden die Zellen in MEM versetzt mit 20 % FCS, 1 % NEAA, 0,1 mg/ml (w/v) Streptomycin und 100 Units/ml Penicillin.

- AT1Br

AT1Br ist eine primäre Zelllinie von menschlichen Fibroblasten, die von einem Patient mit einem Defekt im ATM-Gen stammen. Dieser Patient litt unter der Erbkrankheit *Ataxia-Telangiectasia*. AT1Br-Zellen wurden von der ECACC bezogen (Nummer BM0020) und von

3. Material und Methoden

Prpf. Dr. P. Jeggo zur Verfügung gestellt. Kultiviert wurden die Zellen in HAM's F10-Medium versetzt mit 15 % FCS, 0,1 mg/ml Streptomycin und 100 Units/ml Penicillin.

- **AT7Bi**

AT7Bi ist eine primäre Zelllinie von menschlichen Fibroblasten, die von einem Patient mit einem ATM-Gendefekt stammen. AT7Bi-Zellen wurden von Prof. Dr. P. Jeggo zur Verfügung gestellt. Kultiviert wurden die Zellen in HAM's F10-Medium versetzt mit 15 % FCS, 0,1 mg/ml Streptomycin und 100 Units/ml Penicillin.

- **180Br**

180Br ist eine primäre Zelllinie von menschlichen Hautfibroblasten und stammt aus einem akuten Leukämiepatienten, der nach einer strahlentherapeutischen Behandlung eine starke Überreaktion zeigte und verstarb (Badie et al., 1997). 180Br-Zellen tragen einen Defekt im Lig4-Gen (Riballo et al., 2001). Bezogen wurden 180Br-Zellen von der ECAAC (Nummer 90011862) und wurden von Prof. Dr. P. Jeggo zur Verfügung gestellt. Kultiviert wurden die Zellen in MEM versetzt mit 20 % FCS, 1 % NEAA, 0,1 mg/ml (w/v) Streptomycin und 100 Units/ml Penicillin.

- **P2 bzw. 2BN**

2BN ist eine primäre Zelllinie von menschlichen Zellen und stammen aus einem Patient mit einem Defekt im XLF-Gen (*XRCC4-like Factor*). Dieser Patient charakterisierte sich durch eine starke Strahlenempfindlichkeit und einen Immundefekt (Ahnesorg et al., 2006). 2BN-Zellen wurden von Prof. Dr. P. Jeggo zur Verfügung gestellt. Kultiviert wurden die Zellen in MEM versetzt mit 20 % FCS, 1 % NEAA, 0,1 mg/ml Streptomycin und 100 Units/ml Penicillin.

3.1.6.2. Immortalisierte Zelllinien

- **82-6 hTert**

82-6 hTert ist eine primäre Zelllinie von menschlichen Fibroblasten eines gesunden Probanden, die mit einem hTert-exprimierenden (*human telomerase reverse transcriptase*) Retrovirus transfiziert wurde (Kim et al., 1999). Dadurch wurde die 82-6 hTert-Zelllinie immortalisiert. hTert ist die katalytische Untereinheit der menschlichen Telomerase, die eine Verkürzung der Telomere und somit den Alterungsprozess der Zellen verzögert. 82-6 hTert-Zellen wurden von Prof. Dr. P. Jeggo zur Verfügung gestellt. Die Kultivierung erfolgte in MEM versetzt mit 20 % FCS, 1 % NEAA, 0,1 mg/ml Streptomycin und 100 Units/ml Penicillin.

3. Material und Methoden

- P2- bzw. 2BN-hTert

2BN hTert ist eine primäre Zelllinie von menschlichen Fibroblasten, die durch Transformation mit der katalytischen Untereinheit hTert des Telomerase-Gens immortalisiert wurden. 2BN hTert-Zellen tragen einen Defekt im XLF-Gen und wurden von Dr. P. Jeggo zur Verfügung gestellt. Kultiviert wurden die Zellen in MEM versetzt mit 20 % FCS, 1 % NEAA, 0,1 mg/ml (w/v) Streptomycin und 100 Units/ml Penicillin.

3.1.6.3. Murine embryonale Fibroblasten (MEFs)

Primäre MEFs werden aus E14-17 Mäuseembryos isoliert (Todaro et al., 1963). Diese Zellen sind wachstumsbegrenzt. Die Immortalisierung der Zellen wird üblicherweise mit Hilfe des 3T3-Protokolls durchgeführt. Dabei werden die Zellen jeden 3. Tag auf 3×10^5 Zellen gesplittet. Nach etwa 30 solcher Passagen sind die Zellen immortalisiert, so dass sie unbegrenzt wachsen und die Kontaktinhibition verlieren (Todaro et al., 1963). Dies führt zu der Transformation der primären MEFs und zur Etablierung einer neuen Zelllinie. In dieser Arbeit wurden transformierte knockout MEF-Zelllinien verwendet, die eine vollständige Deletion für ein bestimmtes Reparaturprotein aufweisen. Kultiviert wurden die MEFs in *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) versetzt mit 10 % FCS, 1 % NEAA, 0,1 mg/ml Streptomycin und 100 Units/ml Penicillin.

Tab. 3.1. Verwendete MEF-Zelllinien

| Zelllinie | Beschreibung | Bezugsquelle |
|---------------------------|--|--------------------|
| Kontrolle MEF (H2AX WT) | Immortalisierte MEF, WT zu MEF H2AX -/- | Prof. Dr. P. Jeggo |
| Kontrolle MEF (WT 22) | Immortalisierte MEF, WT zu MEF DNA-PKcs -/- | Prof. Dr. P. Jeggo |
| MEF AT -/- | Immortalisierte MEF, trägt eine Mutation im ATM-Gen | Prof. Dr. P. Jeggo |
| MEF Artemis -/- | Immortalisierte MEF, trägt eine Mutation im Artemis-Gen | Prof. Dr. P. Jeggo |
| MEF Ku80 -/- | Immortalisierte MEF, trägt eine Mutation im Ku80-Gen | Prof. Dr. P. Jeggo |
| MEF Ligase4 -/- p53 -/- * | Immortalisierte MEF, trägt eine Mutation im Ligase4-Gen | Prof. Dr. P. Jeggo |
| MEF DNA-PKcs -/- | Immortalisierte MEF, trägt eine Mutation im Gen für die katalytische Untereinheit der DNA-PK | Prof. Dr. P. Jeggo |
| MEF RAD54 -/- | Immortalisierte MEF, trägt eine Mutation im RAD54- | R. Kanaar |

3. Material und Methoden

| | Gen | |
|------------------------|--|----------------------|
| MEF XRCC2 -/- | Immortalisierte MEF, trägt eine Mutation im XRCC2-Gen | J. Thacker |
| MEF 53BP1 -/- | Immortalisierte MEF, trägt eine Mutation im 53BP1-Gen | Prof. Dr. P. Jeggo |
| MEF MDC-1 -/- | Immortalisierte MEF, trägt eine Mutation im MDC-1-Gen | M. Pendita |
| MEF Lig4 -/- p53 -/- * | Immortalisierte MEF, trägt eine Mutation im Ligase4- und RAD54-Gen | Prof. Dr. G. Iliakis |

* Ligase4 ist ein wichtiges Protein, dessen Mutation für den Organismus letal wirkt. Deswegen musste bei der MEF Ligase -/- Zelllinie zusätzlich das Tumorsuppressorgen p53 ausgeschaltet werden, um das Wachstum der Zellen zu ermöglichen.

3.1.6.4. HeLa

Die HeLa-Zelllinie ist eine etablierte Zelllinie, d.h. sie ist in ihrer Lebensdauer nicht begrenzt. Die HeLa-Zelllinie wurde 1952 als erste Zelllinie etabliert und aus einem Gebärmutterhalstumor einer Patientin namens Henrietta Lacks isoliert. Kultiviert wurden HeLa-Zellen in DMEM versetzt mit 10 % FCS, 1 % NEAA, 0,1 mg/ml Streptomycin und 100 Units/ml Penicillin.

3.2. Methoden

3.2.1. Kultivierung von Zellen

Medien und Lösungen wurden vor der Subkultivierung auf 37 °C vorgewärmt. Zur Subkultivierung der Zellen wurden konfluent gewachsene Zelle zuerst mit PBS gespült, um Mediumreste zu entfernen. Anschließend wurde Trypsin zugegeben und bei 37 °C inkubiert, bis die Zellen von Flaschenböden gelöst waren. Diese wurden in Nährmedium aufgenommen und entsprechend 1/2 bis 1/20 je nach Zelllinie auf neue Flaschen verteilt und mit frischem Medium versetzt. Die Zellen wurden in wassergesättigter Atmosphäre bei 5 % CO₂ und 37 °C kultiviert. Die Zellen wurden für die Experimente hinsichtlich ihrer Dichte so ausplattiert, dass sie sich am Tag des Experiments noch in der exponentiellen Wachstumsphase befanden. Routinemäßig wurden die Zellen einmal bis zweimal pro Woche passagiert. Die Zellen wurden nach maximal 30 Passagen verworfen, weil sich das Problem der karyotypischen Degenerierung von Passage zu Passage verschärfte.

3. Material und Methoden

3.2.1.1. Behandlung der Zellen mit Inhibitoren

Die Zellen wurden 1 h vor der Bestrahlung und für die gesamte Dauer des Versuchs mit 20 μM bzw. 10 μM eines spezifischen ATM bzw. DNA-PKcs Inhibitors bei 37 °C behandelt (Hickson et al., 2004). Danach wurden die Zellen fixiert und angefärbt.

3.2.1.2. Zählen von Zellen

Im Allgemeinen wurden die Zellen während der Routine-Kultivierung nicht gezählt, wohl aber im Laufe einiger Experimente. Die Bestimmung von Zelltitern erfolgte mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer.

3.2.1.3. Einfrieren von Zellen

Konfluent bewachsene Zellkulturflaschen wurden trypsinisiert, d.h. mit PBS einmal gewaschen und anschließend mit einer Menge Trypsinlösung behandelt, die gerade ausreichte, um den Flaschenboden zu bedecken. Sobald sich die Zellen vom Boden ablösten, wurde die Reaktion durch Zugabe eines mehrfachen Volumens Kulturmedium gestoppt und die Zellsuspension bei 1500 rpm/10 min/4 °C zentrifugiert. Das resultierende Pellet wurde in kaltem Gefriermedium aufgenommen und in Kryoröhrchen auf Eis überführt. Die Röhrchen wurden anschließend in einer vorgekühlten Styroporbox in einem -80 °C- Gefrierschrank gestellt, am Folgetag in Flüssigstickstoff überführt und bis zum weiteren Gebrauch gelagert.

3.2.1.4. Auftauen und Expansion von Zellen

Das Auftauen von Kryo-konservierten Zellen erfolgte bei 37 °C im Wasserbad. Die Zellsuspension wurde danach in warmes Zellkulturmedium überführt und zentrifugiert, um die Zellen zu pelletieren und das DMSO-haltige Gefriermedium zu entfernen. Die Zellen wurden anschließend in vorgewärmtem Zellkulturmedium aufgenommen und ausplattiert. Sobald die Kulturflasche erneut konfluent bewachsen war, wurde sie zur weiteren Expansion wieder in entsprechendem Verhältnis (1/2 bis 1/20 je nach Zelllinie) auf neue Flaschen verteilt.

3.2.2. Röntgenbestrahlung

Die Bestrahlung wurde mit einem Röntgengerät vom Typ MCN165/796704 der Firma Phillips durchgeführt. Die Röhrenspannung betrug 90 kV und der Kathodenstrom 19 mA. Das Röntgengerät verfügte über eine Wolframanode und ein Beryllium-Austrittsfenster. Die Strahlung wurde mit einem 2 mm dicken Aluminium-Filter gefiltert. Dieser diente zusätzlich als Trägerplatte für die Probe. Die Entfernung zwischen dem Boden des Röntgengeräts und der Probe betrug 30 cm. Die Dosisleistung betrug 1,96 Gy/min. Die Dosisleistungen wurden durch Fricke-Dosimetrie und eine PTW-Weichstrahlkammer regelmäßig kontrolliert. Die

3. Material und Methoden

Zellbestrahlung erfolgte sowohl auf Glas-Deckgläschen (für die Immunfluoreszenzstudien) als auch auf Zellkulturflaschen (für die Durchflußzytometrieanalyse). Es konnte gezeigt werden, dass Zellen, die auf Glas-Deckgläschen bestrahlt wurden, fast doppelt so viele γ H2AX-Foci aufweisen wie mit gleicher Dosis auf Plastik bestrahlte Zellen (Kegel et al., 2007). Diese Tatsache lässt sich durch die im Glas zusätzlich erzeugten Sekundärelektronen erklären. Dieser Gewichtungsfaktor wurde bei allen Dosisangaben in dieser Arbeit berücksichtigt. Bei allen Versuchen wurden die Zellen nach der Bestrahlung zusätzlich mit Aphidicolin, einem DNA-Polymerase Inhibitor, behandelt.

3.2.3. siRNA (*small interference RNA*)-Analyse

Um die Expression bestimmter Reparaturproteine transient unterdrücken zu können, wurden spezifische Oligonukleotide synthetisiert und in die Zellen transfiziert. Diese Oligonukleotide sind kleine doppelsträngige RNA-Moleküle, die meist aus 21 Nukleotide bestehen, wobei an deren 3'-Enden symmetrische Überhänge von zwei Nukleotide enthalten sind. Die Phosphorylierung der 5'-Enden führt zu deren Aufnahme in den *RNA-Induced Silencing Complex* (RISC) (Hammond et al, 2000). Die Bindung der siRNA wird über RISC vermittelt. Dabei bestimmt die relative Stabilität der Enden des siRNA-Duplex, welcher Strang an die mRNA bindet (Leuschner et al, 2006; Rand et al, 2005). Der gebundene *guide*-Strang programmiert RISC spezifisch mit einer RNA zu interagieren, die eine komplementäre Sequenz aufweist. Das entsprechende Molekül wird gebunden und die mRNA wird nach dem 10. gebundenen Nukleotid des 5'-Endes des Leitstranges der siRNA gespalten (Yuan et al, 2006). Die beschädigte Ziel-mRNA wird anschließend durch zelluläre Nukleasen abgebaut (Tomari und Zamore, 2005). Die Transfektion wurde nach Angaben des Herstellers (RNAi Kit von Qiagen) durchgeführt, um die Expression der ATM-, Artemis-, Ku80-, Rad51- und Ligase4-Proteine zu inhibieren. Der optimale Zeitpunkt der maximalen Proteininhibition wurde für jedes Protein durch Westernblot Analyse bestimmt (durchgeführt von Olivia Barton im Rahmen ihrer Dissertation). Dafür wurden 3,6 μ l (10 nM) der Oligonukleotidlösung in 300 μ l DMEM aufgenommen und mit 36 μ l High Perfect Reagenz vermischt. Die gesamte Mischung wurde für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. 5×10^5 Zellen wurden auf 35 mm² Zellkulturschale, die Deckgläschen enthielten, am Tag der Transfektion ausgesät. Der RNA-Komplex bestehend aus der Oligonukleotidlösung und dem *Hi Perfect*-Reagenz wurde tropfenweise und unter Schwenken der Zellkulturschale den Zellen zugegeben. Die Zellen wurden weiter bei 37 °C kultiviert. Zwei Tage bzw. drei Tage nach der Transfektion wurden die Zellen bestrahlt und bei 37 °C entsprechend der Experimentendauer inkubiert, fixiert und angefärbt. Die Präparate wurden wie in Abschnitt 3.2.5. beschrieben ausgewertet.

3. Material und Methoden

3.2.4. Immunfluoreszenzstudien

3.2.4.1. Markierung der Zellen mit BrdU

Die Zellen wurden für 1 h (bei primären Fibroblasten) bzw. 30 min (bei MEFs) mit 10 nM BrdU pulsmarkiert. Danach wurde zweimal mit PBS gewaschen, um das BrdU vollständig zu entfernen. Die Zellen wurden mit frischem Medium versetzt und bei 37 °C weiter inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in Zellkulturflaschen (für die Durchflußzytometrie) bzw. in Zellkulturschalen, in denen sich Deckgläschen befanden, bestrahlt. Nach der Bestrahlung wurden die Zellen für die gesamte Dauer des Experiments bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen fixiert und angefärbt. Bei einigen Experimenten wurden die Zellen über die gesamte Dauer mit BrdU markiert (siehe Ergebnisteil).

3.2.4.2. Fixierung und Permeabilisierung der Zellen

3.2.4.2.1. Mit Methanol/Aceton

Die auf Deckgläschen gewachsenen Zellen wurden nach dem Entfernen des Zellkulturmediums für mindestens 30 min bei -20 °C in Methanol fixiert. Anschließend wurden die Deckgläschen für 1 min in einem Acetonbad bei -20 °C permeabilisiert. Die Deckgläschen wurden dreimal mit PBS/1 %FCS gewaschen und konnten direkt angefärbt werden. Alternativ wurden die Deckgläschen auch über Nacht in PBS/1 % FCS bei 4 °C bis zur anschließenden Färbung gelagert. Die Fixierung von MEF-Zelllinien erfolgte in dieser Arbeit hauptsächlich mit Methanol/Aceton.

3.2.4.2.2. Mit Formaldehyd/Triton

Die Deckgläschen wurden mit 2 % Formaldehyd in PBS bei Raumtemperatur für 15 min fixiert und dreimal mit PBS unter Schwenken gewaschen. Danach wurden die Deckgläschen mit 0,25 % Triton X-100 in PBS/1 % FCS für 10 min auf Eis permeabilisiert. Anschließend wurden die Deckgläschen dreimal mit PBS/1 % FCS gewaschen und bei 4 °C bis zur anschließenden Färbung gelagert. Diese Fixierung wurde für primäre Zelllinien und die HeLa- Zellen eingesetzt.

3.2.4.3. Immunfluoreszenzfärbung von Zellen

3.2.4.3.1. CENP-F/ γ H2AX-Doppelfärbung

Die fixierten Deckgläschen wurden in einer feuchten Kammer auf Parafilm mit der Zellseite nach oben gelegt. Die beiden primären Antikörper (*rabbit* anti-CENP-F und *mouse* anti- γ H2AX) wurden 1:200 in PBS/1 % FCS verdünnt und je 40 μ l auf die Deckgläschen pipettiert. Die Inkubation erfolgte für 1 h bei RT. Danach wurden die Deckgläschen dreimal für 10 min mit PBS/1 % FCS gewaschen. Die Deckgläschen wurden mit je 40 μ l der 1:500

3. Material und Methoden

verdünnten sekundären Antikörperlösung (*goat anti-rabbit* 594 und *goat anti-mouse* 488) für 1 h bei RT lichtgeschützt inkubiert. Anschließend wurde in der Dunkelheit viermal mit PBS gewaschen. Die Deckgläschen wurden mit je 80 µl einer 0,2 µg/ml konzentrierten DAPI-Lösung für 5 min überschichtet. Danach wurden die Deckgläschen einmal für 10 min mit PBS gewaschen. Anschließend wurden je 3 µl Mounting Medium auf den Objektträger getropft, die Deckgläschen darauf gelegt und mit Nagellack versiegelt. Die Objektträger konnten bei 4 °C über mehrere Tage gelagert werden.

3.2.4.3.2. BrdU/CENP-F/γH2AX-Dreifachfärbung

Die Färbung verlief wie in Abschnitt 3.2.4.3.2. beschrieben. Die erste primäre Antikörperlösung bestand aus *mouse anti-γH2AX* und *rabbit anti-CENP-F*, die 1:200 in PBS/1 %FCS verdünnt wurden. Als zweite primäre Antikörperlösung wurde *sheep anti-BrdU* bei einer Verdünnung von 1:200 verwendet. Die sekundäre Antikörperlösung setzte sich aus *goat anti-mouse* 488, *goat anti-rabbit* 546 und *donkey anti-sheep* 594 in einer Verdünnung von jeweils 1:500 in PBS/1 % FCS zusammen.

3.2.4.3.3. phosphoATM/CENP-F-Doppelfärbung

Die fixierten Zellen wurden wie in Abschnitt 3.2.4.3.1. beschrieben angefärbt. Die primäre Antikörperlösung bestand aus einer Mischung von *mouse anti-pATM* und *rabbit anti-CENP-F*, die 1:200 in PBS/1 % FCS verdünnt wurden. Als sekundäre Antikörper wurden *goat anti-mouse* 488 und *goat anti-rabbit* 594 in einer Verdünnung von 1:500 in PBS/1 % FCS eingesetzt.

3.2.4.3.4. phosphoATM/γH2AX-Doppelfärbung

Die fixierten Zellen wurden wie in Abschnitt 3.2.4.3.1. beschrieben angefärbt. Die primäre Antikörperlösung bestand aus einer Mischung von *mouse anti-pATM* und *rabbit anti-γH2AX*, die 1:200 in PBS/1 % FCS verdünnt wurden. Als sekundäre Antikörper wurden *goat anti-mouse* 488 und *goat anti-rabbit* 594 in einer Verdünnung von 1:500 in PBS/1 % FCS eingesetzt.

3.2.4.3.5. PhosphoH3/γH2AX-Doppelfärbung

Diese Färbung wurde hauptsächlich bei MEFs-Zellen durchgeführt. Die mit Methanol/Aceton fixierten Zellen wurden analog zu Abschnitt 3.2.4.3.1. beschrieben, angefärbt. Allerdings wurden vor dem Einsatz der primären Antikörper (*mouse anti-γH2AX* und *rabbit anti-phospho H3*) die Deckgläschen für 30 min mit 10 % FCS in PBS bei RT überschichtet. Dieser zusätzliche Blockierungsschritt bei MEFs-Zellen diente der Reduzierung der starken

3. Material und Methoden

Hintergrundfärbung. Als sekundäre Antikörper wurden *goat anti-mouse* 488 und *goat anti-rabbit* 594 in einer Verdünnung von 1:500 in PBS/1 % FCS eingesetzt.

Tab. 3.2. Zusammenfassung der Antikörperlösungen

| Färbungsart | Primäre Antikörper | Sekundäre Antikörper |
|-----------------|--|---|
| Doppelfärbung | <i>mouse anti-γH2AX</i> 1:200 und <i>rabbit anti-CENP-F</i> 1:200 | <i>goat anti-mouse</i> 488 1:500 und <i>goat anti-rabbit</i> 594 1:500 |
| Doppelfärbung | <i>mouse anti-ATM</i> 1:200 und <i>rabbit anti-CENP-F</i> 1:200 | <i>goat anti-mouse</i> 488 1:500 und <i>goat anti-rabbit</i> 594 1:500 |
| Doppelfärbung | <i>mouse anti-ATM</i> 1:200 und <i>rabbit anti-γH2AX</i> 1:200 | <i>goat anti-mouse</i> 488 1:500 und <i>goat anti-rabbit</i> 594 1:500 |
| Doppelfärbung | <i>mouse anti-γH2AX</i> 1:200 und <i>rabbit anti-phosphoH3</i> 1:100 | <i>goat anti-mouse</i> 488 1:500 und <i>goat anti-rabbit</i> 594 1:500 |
| Dreifachfärbung | <i>mouse anti-γH2AX</i> 1:200 und <i>rabbit anti-CENP-F</i> 1:200 und <i>sheep anti-BrdU</i> 1:200 | <i>goat anti-mouse</i> 488 1:500 und <i>goat anti-rabbit</i> 546 1:500 und <i>donkey anti-sheep</i> 594 1:500 |

3.2.5. Auswertung der γ H2AX- und ATM-Foci

Die Objektträger wurden am Fluoreszenz-Mikroskop ausgewertet. Dabei wurde die Anzahl der Foci pro Zellkern quantifiziert. In der Regel wurden mindestens 40 Zellkerne ausgewertet. Die Charakterisierung von MEFs erforderte aufgrund der häufig sehr unterschiedlichen Größe der Zellkerne die Analyse einer deutlich größeren Anzahl an Zellkernen. Die durchschnittliche Focizahl wurde dann aus den gesamten ausgewerteten Zellkernen errechnet. Es wurden sowohl G1- als auch G2-Zellen ausgewertet. CENP-F in humanen Zellen (Liao, H et al, 1995; Rattner, J.B et al, 1993) und phosphoH3 in murinen Zellen (Hendzel, M.J et al, 1997) dienten als G2-Marker

3.2.6. Durchflußzytometrie

Die Zellen wurden in 25 cm²-Zellkulturflaschen so passagiert, dass sie sich am Tag des Experiments in der exponentiellen Wachstumsphase befanden. Vor der Bestrahlung wurden die exponentiell wachsenden Zellen (ungefähr 250000 Zellen) für 30 min bzw. 1 h je nach

3. Material und Methoden

Zelltyp mit 10 μ M BrdU markiert. Danach wurden die Zellen abtrypsiniert und in die FACS-Röhrchen (BD-Falcon, 5 ml) überführt. Die Zellen wurden mit 300xg für 10 min bei 4 °C pelletiert und das Pellet wurde anschließend mit PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen nochmals bei 300xg für 10 min bei 4 °C abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde durch tröpfchenweise Zugabe von 70 % eiskaltem Ethanol am Vortex fixiert und anschließend bei -20 °C gelagert. Am Tag der Analyse wurden die Zellen mit 300xg für 10 min abzentrifugiert, mit PBS gewaschen und nochmals für 10 min bei 300xg abzentrifugiert. Danach wurden die Zellen mit 1 ml 2 M Salzsäure für 20 min behandelt und wieder für 10 min bei 300xg sedimentiert. Die Zellen wurden mit PBS/1 % FCS für 10 min bei 300xg gewaschen und das Zellpellet in 500 μ l 0,1 M Natrium-Tetraborat für 2 min bei RT resuspendiert. Die Zellen wurden bei 300xg 10 min abzentrifugiert und das Pellet wurde mit 20 μ l einer anti-BrdU-FITC gekoppelten Antikörperlösung für 30 min in der Dunkelheit bei RT aufgenommen. Die Zellen wurden in PBS/1 % FCS resuspendiert und für 10 min mit 300xg bei 4 °C abzentrifugiert. Die gefärbten Zellen wurden mit 500 μ l einer Propidiumiodid-Lösung für mindestens 30 min versetzt. Anschließend wurden die Zellen im FACScan analysiert. Es wurden dabei mindestens 10000 Ereignisse je Probe aufgenommen. Die Fluoreszenzemission wurde mit einem Laser bei 488 nm angeregt und die Propidiumiodid-Lösung bzw. Grünfluoreszenz bei FITC-konjugiertem Antikörper bestimmt. Die Datenaufnahme und -analyse erfolgte mit dem Programm „Cell Quest“.

4. Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit sollte die Reparatur von DNA-DSBs sowohl in der G1- als auch G2-Phase des Zellzyklus untersucht werden. Dabei sollte die Reparaturgeschwindigkeit in beiden Zellzyklusphasen verglichen werden. Durch die Charakterisierung von Zellen mit Mutationen in bestimmten Reparaturproteinen sollte der Beitrag dieser Proteine zur DSB-Reparatur untersucht werden. Als Vergleich dienten WT-Zelllinien, die reparaturprofizient sind.

In der Literatur werden bestimmte Proteine dem NHEJ bzw. der HR zugeordnet. In der G1-Phase ist hauptsächlich das NHEJ aktiv, wohingegen in der G2-Phase die HR als alternativer Reparaturweg zur Verfügung steht. Um den Anteil der verfügbaren Reparaturwege an der DSB-Reparatur in G2 zu untersuchen, wurden Zelllinien mit Defizienzen in wichtigen Komponenten der HR bzw. des NHEJ verwendet. Dafür wurden die Experimente in asynchron wachsenden Zellen durchgeführt und G1- und G2-Phase-Zellen ausgewertet. Allerdings sind die Zellen in den jeweiligen Zellzyklusphasen nicht dauerhaft arretiert, wie es bei konfluenten Zellen der Fall ist, sondern durchlaufen ständig den Zellzyklus.

Zur zellzyklusphasen-spezifischen Untersuchung der DSB-Reparatur können die Zellen durch Synchronisation in der jeweiligen Zellzyklusphase angereichert werden. Eine Synchronisation kann durch chemische Methoden oder durch FACS-Sortierung erzielt werden. Um Zellen vorwiegend in der G1/G0-Phase anzureichern, kann eine Synchronisation durch Serumentzug oder Isoleucinmangel angewendet werden (Lindl, 2002). Durch Zugabe von Aphidicolin ins Zellkulturmedium wird die DNA-Synthese blockiert und eine Anreicherung der Zellen in der S-Phase erreicht. Durch Überführung von Zellen in ein Nocodazol-haltiges Zellkulturmedium werden sie aufgrund der Hemmung der Mikrotubuli-Dynamik am G2/M-Übergang arretiert. Die FACS-Sortierung ist eine sehr elegante Methode, die die Isolierung von Zellen in einer Zellzyklusphase ermöglicht, ohne dass diese einer Chemikalieneinwirkung ausgesetzt sind. Die Zellen können aus einer exponentiellen Kultur heraussortiert werden. So können Zellen zu etwa 85 % in der S-Phase angereichert werden (Doyle et al., 1998). Allerdings sind diese Methoden sehr zeitaufwendig und die Ausbeute ist meist gering, sodass sehr viel Zellmaterial eingesetzt werden muss. Wichtiger für die in dieser Arbeit untersuchte Fragestellung ist jedoch, dass bereits durch die Synchronisation (chemische Synchronisation) DNA-Schäden

4. Ergebnisse

entstehen könnten (Sonoda, 2006; Kurose et al., 2006). Aus diesem Grund wurden die Zellen im Folgenden nicht synchronisiert. Um dennoch eine zellzyklusphasenspezifische Auswertung zu ermöglichen, wurden stattdessen Zellzyklusmarker angewendet, die die Unterscheidung von G1-, S- und G2-Zellen erlauben. So kann die Auswertung der DSB-Reparatur in diesen Zellzyklusphasen simultan durchgeführt werden.

4.1. Identifizierung von Zellzyklusphasen in einer asynchron wachsenden Zellpopulation

4.1.1. Anwendung von CENP-F als Zellzyklusmarker-Protein

Um in asynchron wachsenden humanen Zellen die Zellzyklusphasen voneinander zu unterscheiden, wurden in den humanen Zellen neben γ H2AX auch CENP-F (Zentromer Protein-F) angefärbt. CENP-F lokalisiert am Zentromer und ist an der Bildung von Mikrotubuli beteiligt. Die Expression von CENP-F ist transient und zellzyklusabhängig. Sie beginnt in der späten S-Phase, ist in der G2-Phase am stärksten, wo es homogen im Zellkern verteilt vorliegt, und findet sich in der Mitose am Ansatzpunkt des Spindelapparats an den Zentrosomen (Liao et al., 1995; Kao et al., 2001). G1-Zellen zeigen demnach eine negative CENP-F-Färbung, während in S- und G2-Zellen ein pannukleäres CENP-F-Signal vorliegt. Dieses ist in G2-Zellen deutlich intensiver als in S-Zellen. Die Unterscheidung von S-Zellen erfolgte zudem über ein starkes, flächiges γ H2AX-Signal, welches auf den Zusatz des Polymeraseinhibitors Aphidicolin zurückzuführen ist. Aphidicolin wirkt als Hemmer der Replikation und verursacht in der S-Phase zahlreiche Strangbrüche, die die Phosphorylierung des Histons H2AX hervorrufen. M-Zellen weisen eine punktförmige CENP-F-Färbung auf, welche die zentromere Region der Chromosomen widerspiegelt.

Zur Dokumentation der Identifikationskriterien verschiedener Zellzyklusphasen, wurden immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von menschlichen WT-Zellen gemacht. Dafür wurden exponentiell auf Deckgläschen wachsende Zellen mit 2 Gy IR bestrahlt und bei 37° C inkubiert. 6 h nach Bestrahlung wurden die Zellen fixiert und mit γ H2AX- und CENP-F-spezifischen Antikörpern angefärbt. Zudem wurde die DNA mit dem interkalierenden Farbstoff DAPI gegengefärbt (Abb. 4.1.).

4. Ergebnisse

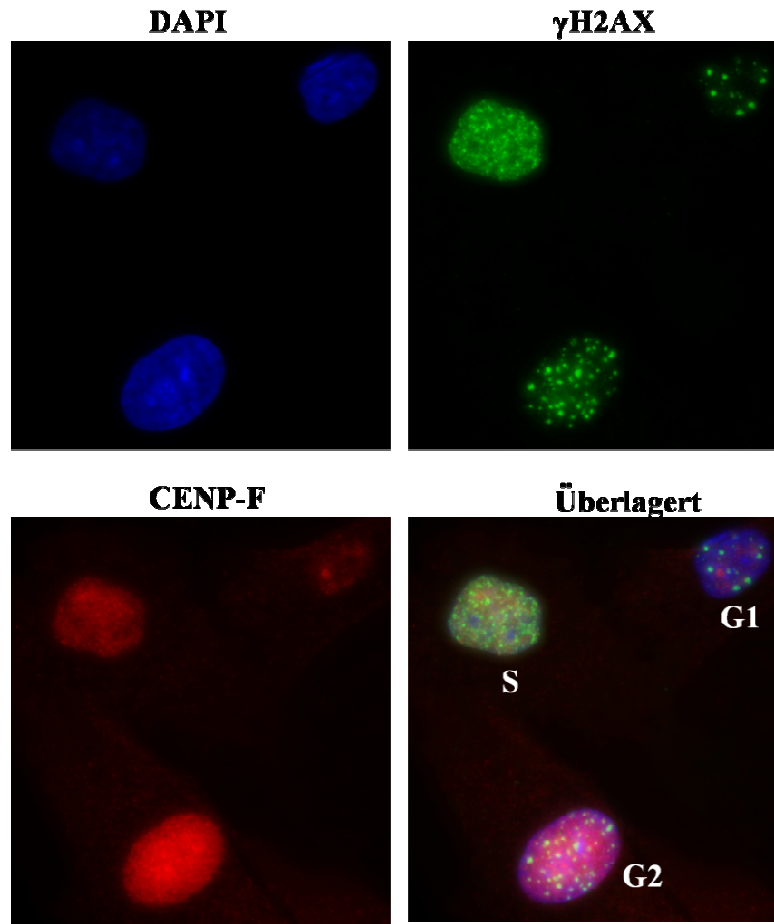


Abb 4.1. Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von WT-Zellen (HSF-1) nach 2 Gy Röntgen-Bestrahlung und 6 h Reparaturzeit. Exponentiell wachsende Zellen wurden mit 2 Gy IR bestrahlt, mit Aphidicolin behandelt und für 6 h bei 37° C zur Reparatur inkubiert. Danach wurden die Zellen fixiert und mit γH2AX (grün)- und CENP-F (rot)-spezifischen Antikörpern angefärbt. Die DNA wurde mit DAPI (blau) gegengefärbt. Dargestellt sind G1-, S- und G2-Zellen. Die Bilder wurden bei 1000facher Vergrößerung aufgenommen. Im unteren rechten Bild wurden die Zellen entsprechend ihren Zellzyklusphasen beschriftet. Die Identifizierung erfolgte anhand des spezifischen Farbmusters der γH2AX- und CENP-F-Signale.

Die Abb. 4.1. zeigt drei Zellen, die sich in unterschiedlichen Zellzyklusphasen (G1-, S- und G2-Phase) befinden. Der Zellkern der G1-Zelle weist keine homogene CENP-F-Färbung auf, da in der G1-Phase CENP-F nicht oder kaum exprimiert wird. In der G2-Phase, wo die Expression des CENP-F-Proteins am stärksten ist, zeigt die G2-Zelle eine im Zellkern homogene starke rote Färbung. Der Zellkern der S-Zelle weist ebenfalls eine homogene rote CENP-F-Färbung auf, die allerdings weniger intensiv als in der G2-Phase ist (Abb.4.1. unten links).

Diese Kriterien korrelieren mit der Intensität des DAPI-Signals, das Aufschluss über den DNA-Gehalt einer Zelle gibt. G2-Zellen weisen in der DAPI-Färbung eine höhere DAPI-Intensität als G1-Zellen auf, was den doppelten DNA-Gehalt einer G2-Zelle gegenüber einer G1-Zelle widerspiegelt. Die Fluoreszenzintensität einer S-Zelle liegt zwischen der von G1-

4. Ergebnisse

und G2-Zellen, was sich auf den intermediären DNA-Gehalt einer S-Zelle zurückführen lässt (Abb. 4.1. oben links).

G1- und G2-Zellen weisen in der γ H2AX-Färbung punktförmige γ H2AX-Foci auf, wobei G2-Zellen deutlich mehr Foci als G1-Zellen haben, da aufgrund des doppelten DNA-Gehalts in einer G2-Zelle mehr Brüche verursacht werden. Die Zahl der γ H2AX-Foci in S-Zellen lässt sich aufgrund des sehr starken grünen Hintergrunds, der durch Zugabe von Aphidicolin verursacht wird, nicht erfassen. Allerdings erlaubt dieses starke γ H2AX-Signal die eindeutige Unterscheidung zwischen S- und G2-Zellen, die beide ein pannukleäres CENP-F-Signal aufweisen (Abb. 4.1. oben rechts).

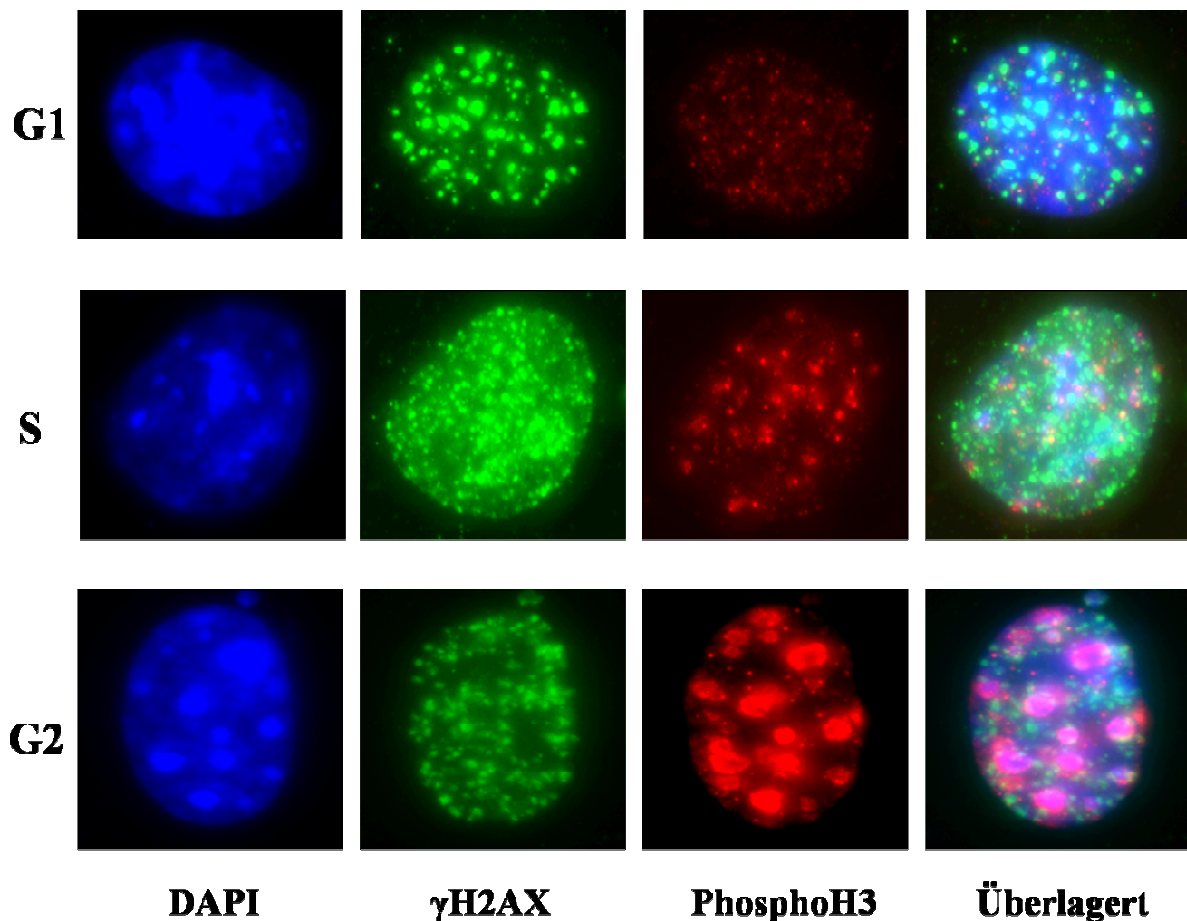
Mit Hilfe dieser Kriterien kann die Zellzyklusphase einer Zelle eindeutig identifiziert werden. Somit ist die Untersuchung des Reparaturvermögens einer Zellpopulation in einer gewünschten Zellzyklusphase möglich. Allerdings ist die Anwendung von CENP-F als G2-Marker in murinen Zellen nicht möglich, da es keinen murinen anti-CENP-F-Antikörper zur Verfügung in unserem Labor stand, deswegen wurde ein anderer Marker zur Identifizierung der Zellzyklusphasen angewendet.

4.1.2. Nachweis von phosphoH3 als Zellzyklusmarker

Zur Unterscheidung der G1- und der G2-Phase wurde in MEFs (murine embryonale Fibroblasten) eine phosphoH3-Färbung durchgeführt. Histon H3 kann an Serin10 phosphoryliert werden, und diese Phosphorylierung ist vermutlich für die Chromosomenkondensation während der Zellteilung von Bedeutung (Hendzel et al., 1997; Goto et al., 1999). Die Phosphorylierung an Serin10 beginnt während der späten G2-Phase in der perizentrischen Region des Heterochromatins und breitet sich bis zur Prophase über die gesamte Länge des Chromosoms aus (Hendzel et al., 1997). Am stärksten ist die Phosphorylierung während der Prometaphase/Anaphase, wenn die Chromosomen vollständig kondensiert sind, was bis zur Anaphase andauert. Danach verschwindet sie wieder (Hendzel et al., 1997; Van Hooser et al., 1998). Die Phosphorylierung an Serin10 des Histons H3 kann durch einen spezifischen Antikörper detektiert werden. Die Immunfluoreszenzfärbung weist ein zellzyklusphasenspezifisches Färbungsmuster auf, das die Erkennung der G2-Zellen ermöglicht (Hendzel et al., 1997). Die Zellkerne von phosphoH3-positiven G2-Zellen zeigen ein punktförmiges Muster, das auf kondensiertes Chromatin zurückzuführen ist. G1-Zellen dagegen weisen ein negatives phosphoH3-Signal auf (Abb. 4.2.).

4. Ergebnisse

Zur Unterscheidung von Zellzyklusphasen bei MEFs wurden exponentiell auf Deckgläschen wachsende Zellen mit Aphidicolin versetzt und bei 37° C für 8 h inkubiert. Danach wurden die Zellen fixiert und mit γ H2AX- und phosphoH3-Antikörpern angefärbt. Zusätzlich wurde die DNA mit DAPI angefärbt, um die Zellkerne sichtbar zu machen.



4.2. Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von mit 2 Gy IR bestrahlten Ligase4/Rad54-defizienten MEF-Zellen und 8 h Reparaturzeit. Exponentiell wachsende Zellen wurden mit 2 Gy IR bestrahlt, mit Aphidicolin versetzt und für 8 h bei 37° C inkubiert. Danach wurden die Zellen fixiert und gegen γ H2AX (grün) und phosphoH3 (rot) mit Hilfe spezifischer Antikörper angefärbt. Die Zellkerne wurden mit DAPI sichtbar gemacht. Dargestellt sind G1-, S- und G2-Zellen. G2-Zellen weisen in der phosphoH3-Färbung in ihren Zellkernen dicke punktförmige Bereiche auf, die heterochromatische Bereiche darstellen (erkennbar an der Kolokalisation mit intensiv gefärbten DAPI-Regionen). G1-Zellen werden in der phosphoH3-Färbung nicht angefärbt. S-Zellen weisen eine schwache homogene PhosphoH3-Färbung auf, allerdings ohne dicke punktförmige Bereiche. Die Bilder wurden bei 1000facher Vergrößerung aufgenommen.

Wie unter 4.1.1. beschrieben wurden die Zellzyklusphasen anhand des DNA-Gehalts unterschieden (Abb. 4.2. erste Spalte links).

G1-, S- und G2-Zellen weisen in der γ H2AX-Färbung ein ähnliches Färbungsmuster, wie im Kap. 4.1.1. beschrieben, auf (Abb. 4.2. zweite Spalte links).

4. Ergebnisse

G1-Zellen zeigen kein positives phosphoH3-Signal, da in der G1-Phase keine Chromosomenkondensation stattfindet und H3 somit nicht phosphoryliert wird. G2-Zellen dagegen weisen in der phosphoH3-Färbung punktförmige Bereiche auf, die auf die Phosphorylierung von H3 während der Kondensation der DNA in Vorbereitung auf die Mitose zurückzuführen sind. S-Zellen weisen wie G1-Zellen auch ein negatives PhosphoH3-Signal auf, da die Chromatinkondensation erst in der späten G2-Phase beginnt. Allerdings zeigen S-Zellen im Vergleich zu G1-Zellen eine etwas stärkere flächige Färbung der Zellkerne (Abb. 4.2. zweite Spalte rechts).

Die Verwendung von Aphidicolin und von CENP-F- bzw. phosphoH3-spezifischen Antikörpern erlaubt die Unterscheidung von G1-, S- und G2-Zellen bei menschlichen und murinen Zellen in der Immunfluoreszenzmikroskopie. Somit kann die Quantifizierung der Doppelstrangbrüche (DSBs) in diesen Zellzyklusphasen durchgeführt werden.

Aphidicolin kann als Replikationshemmer replikationsbedingte Doppelstrangbrüche (DSBs) verursachen, die eine γ H2AX-Phosphorylierung hervorrufen. Dies ist für S-Zellen aufgrund der starken γ H2AX-Hintergrundfärbung bekannt (Abb. 4.1. und 4.2.). Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass Aphidicolin in der G1- und G2-Phase eventuell auch Foci verursacht. Falls dies der Fall sein sollte, wird die Auswertung der strahleninduzierten DSBs in G1- und G2-Zellen durch Verwendung von Aphidicolin beeinträchtigt. Deswegen soll zuerst der Einfluss von Aphidicolin auf die DSB-Reparatur in diesen Zellzyklusphasen ausgeschlossen werden, um eine Verfälschung der Ergebnisse zu vermeiden.

4.2. Untersuchung des Einflusses von Aphidicolin auf den Zellzyklus und auf die Reparatur strahleninduzierter DSBs

Zur Überprüfung eines möglichen Einflusses von Aphidicolin auf die Zellzyklusprogression und die DSB-Reparatur wurden Experimente mit reparaturprofizienten WT-Zellen, in An- und Abwesenheit von Aphidicolin durchgeführt. Die Ergebnisse sollen bei der Etablierung der optimalen Versuchsbedingungen für die späteren Reparaturstudien helfen.

4.2.1. Zellzyklusverteilung von menschlichen und murinen Fibroblasten in An- und Abwesenheit von Aphidicolin nach Bestrahlung mit 1 Gy IR

Aphidicolin (Aph) ist ein Hemmer der DNA-Polymerase α und δ (Sala et al., 1980), welche an der DNA-Synthese beteiligt ist und eine wichtige Rolle in der S-Phase spielt (Wood und Shivji, 1997; Menges und Murray, 2002). Die Hemmung der DNA-Polymerasen durch

4. Ergebnisse

Aphidicolin führt zu einer Blockade der Replikationsgabel und verhindert so die DNA-Synthese. Die Zellen werden in der S-Phase arretiert.

Um die Reparaturkapazität in einer Zellzyklusphase zu analysieren, können nur diejenigen Zellen in Betracht gezogen werden, die sich bereits vor der Bestrahlung in der jeweiligen Zellzyklusphase befanden. Zwar werden durch die Aktivierung von Checkpoints die Zellen für eine gewisse Zeit in einer Zellzyklusphase arretiert. Doch gerade bei der Analyse der G2-Phase besteht das Problem, dass Zellen aus der S-Phase frühzeitig in die G2-Phase eintreten können, da die intra-S-Phase-Checkpoints erst bei hohen Dosen vollständig aktiviert werden (Merrick et al., 2004). Um den Übertritt von S-Zellen in die G2-Phase und somit eine Durchmischung von in der S- und der G2-Phase bestrahlten Zellen zu verhindern, wurde Aphidicolin eingesetzt. Somit kann sichergestellt werden, dass jede analysierte G2-Zelle bereits zum Zeitpunkt der Bestrahlung in G2 war. Die Durchflusszytometrie (FACS) wird hier angewendet, um zu analysieren, ob die für die DSB-Reparaturanalyse verwendete Dosis von 2 Gy ausreichend ist, um die Zellen in der G2-Phase zu halten. Dieser Versuch ist ausschlaggebend, um die maximale Versuchsdauer der DSB-Reparaturuntersuchung in der G2-Phase bestimmen zu können. Bei der Analyse der Zellzyklusprogression wurden reparaturprofiziente humane und murine Fibroblasten verwendet.

Zur Durchführung der FACS-Analyse wurden exponentiell wachsende Zellen 1 h mit dem Thymidinanalogon BrdU pulsmarkiert. Nach der BrdU-Pulsmarkierung wurden die Zellen mit 1 Gy IR bestrahlt und mit Aphidicolin versetzt. Parallel dazu wurden auch Proben ohne Aphidicolin mitgeführt. Die Zellen wurden für 2 h, 4 h, 6 h und 8 h nach der Bestrahlung bei 37° C zur Reparatur inkubiert und danach geerntet. Als Kontrolle wurde eine unbestrahlte Probe direkt nach BrdU-Markierung bearbeitet. Nach der Ernte wurden die Zellen fixiert, gewaschen und mit einem FITC-gekoppelten BrdU-Antikörper sowie dem interkalierenden DNA-Farbstoff Propidiumiodid angefärbt. Die Auswertung der Proben erfolgte am Durchflusszytometer mit Hilfe des Programms *Cell Quest* von Becton-Dickinson. Zu jedem untersuchten Zeitpunkt konnte ein FACS-Plot erstellt werden, indem das Signal des FITC-gekoppelten anti-BrdU-Antikörpers (Y-Achse) gegen das Propidiumiodid-Signal (X-Achse) aufgetragen wurde (Abb. 4.3.). Die Intensität des FITC-Signals erlaubt die Unterscheidung von BrdU-positiven gegenüber BrdU-negativen Zellen. Das Propidiumiodid-Signal gibt ähnlich wie die DAPI-Intensität in der Immunfluoreszenz (Abb. 4.1.) Aufschluss über den DNA-Gehalt einer Zelle und ermöglicht die Unterscheidung von G1-, S- und G2-Zellen.

4. Ergebnisse

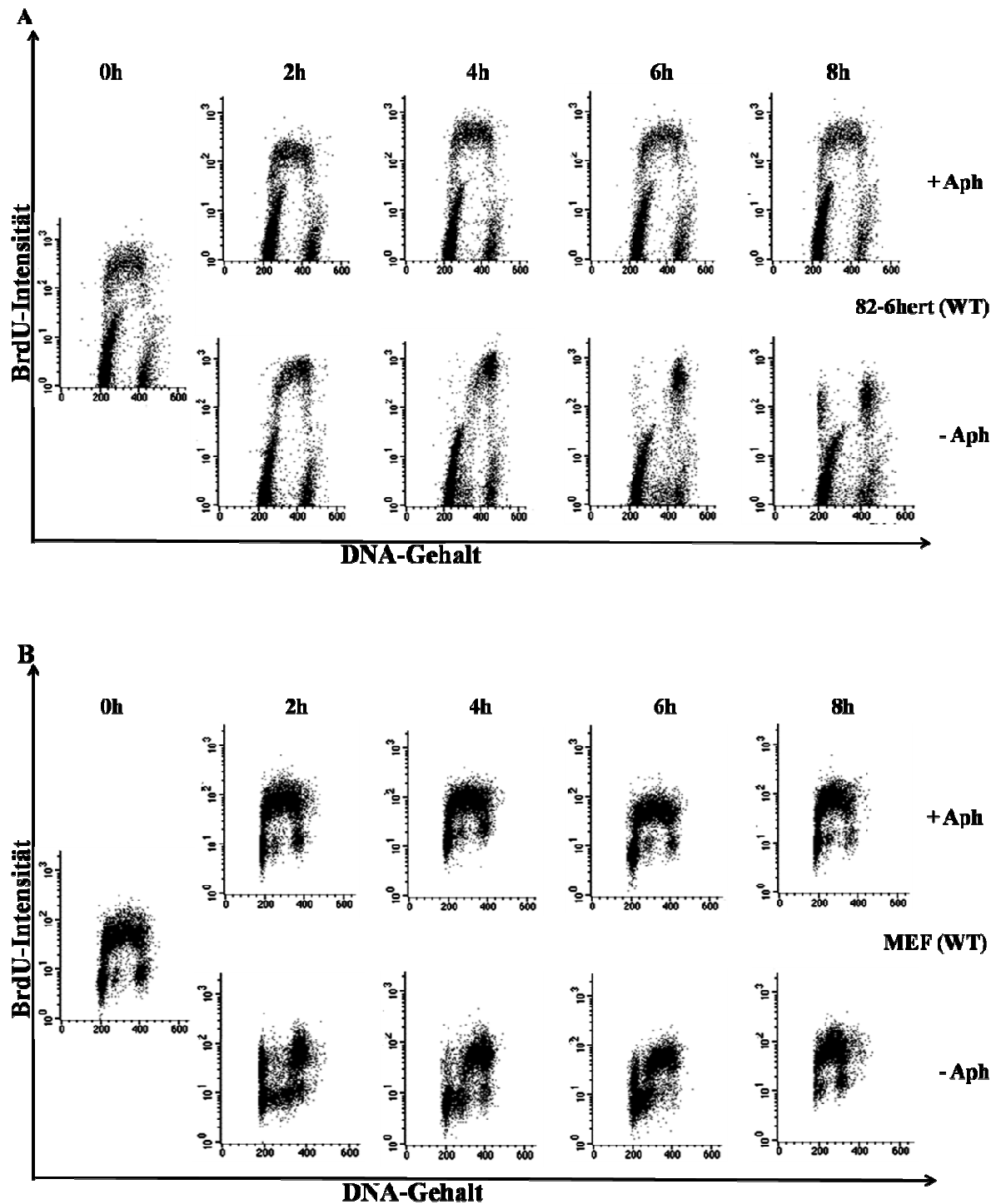


Abb 4.3. Dot plots nach BrdU-Einbau in primären menschlichen Fibroblasten (A) und transformierten embryonalen Mausfibroblasten (B) und Inkubation mit bzw. ohne Aphidicolin (Aph). Exponentiell wachsende WT-Zellen wurden mit BrdU für 1 h pulsmarkiert, mit 1 Gy IR bestrahlt und danach mit Aphidicolin versetzt bzw. ohne Aphidicolin inkubiert. Unmittelbar nach der BrdU-Markierung und 2 h, 4 h, 6 h und 8 h nach der Bestrahlung wurden die Zellen fixiert und mit einem FITC-gekoppelten BrdU-Antikörper und Propidiumiodid angefärbt. Die Fluoreszenzintensität wurde in einem FACS-Gerät gemessen. Auf der Abszisse ist linear der DNA-Gehalt anhand der Intensität des PI-Signals abgebildet. Auf der Ordinate ist in logarithmischer Darstellung die BrdU-Intensität aufgetragen. Das Propidiumiodid-Signal spiegelt den DNA-Gehalt wider, wobei G2-Zellen einen doppelt so hohen DNA-Gehalt wie G1-Zellen zeigen. S-Zellen liegen dazwischen.

4. Ergebnisse

Primäre menschliche Fibroblasten treten in Abwesenheit von Aphidicolin bereits 4 h nach Bestrahlung mit 1 Gy IR aus der S- in die G2-Phase ein. 8 h nach Bestrahlung kommen die BrdU-positiven Zellen in der G1-Phase an (Abb. 4.3.A). In Anwesenheit von Aphidicolin wird die Progression durch den Zellzyklus blockiert, die Mehrheit der Zellen verbleibt in der S-Phase (Abb. 4.3.A).

Mausfibroblasten zeigen eine deutlich schnellere Progression durch die verschiedenen Zellzyklusphasen. In Abwesenheit von Aphidicolin treten schon 2 h nach Bestrahlung mit 1 Gy IR die BrdU-markierten Zellen in die G2-Phase ein, nach 4 h haben sich die ersten Zellen geteilt und befinden sich in der G1-Phase, 8 h nach Bestrahlung befindet sich die Mehrheit der markierten Zellen wieder in der S-Phase (Abb. 4.3.B). Die schnelle Progression vom MEFs gegenüber menschlichen Fibroblasten korreliert mit einer höheren Wachstumsrate dieser Zellen in der Zellkultur. In der Gegenwart von Aphidicolin verbleibt bei den MEFs, ähnlich wie bei menschlichen Fibroblasten, die Mehrheit der Zellen in der S-Phase (Abb. 4.3.B).

Anhand dieser Experimente kann gezeigt werden, dass Aphidicolin die Progression der Zellen im Zellzyklus wirksam unterbindet. So konnte sichergestellt werden, dass keine Zellen von der S-Phase in die G2-Phase eintreten. Zudem konnte gezeigt werden, dass die verwendete Röntgendosis von 1 Gy IR ausreicht, um die Reparaturstudien bis zu 8 h nach Bestrahlung durchzuführen. Innerhalb dieses Zeitraums verbleiben in der G2-Phase bestrahlte Zellen auch in dieser Zellzyklusphase und treten nicht in die Mitose ein. Die G2-Zellen können die Reparatur innerhalb des beobachteten Zeitfensters nicht abschließen und die G2-Phase verlassen. Somit wird vermieden, dass nach langen Zeiten nur mehr G2-Zellen vorhanden sind, die ein hohes Restschadensniveau aufweisen.

4.2.2. Einfluss von Aphidicolin auf die Reparatur von DNA-DSBs

Aphidicolin als Hemmer der DNA-Polymerase verursacht in der S-Phase die Entstehung replikations-assoziierten DSBs, die nicht von strahleninduzierten DSBs unterschieden werden können. Dadurch trägt Aphidicolin zur Erhöhung der Anzahl an DSBs bei. Um auszuschließen, dass Aphidicolin auch eine Wirkung in anderen Zellzyklusphasen zeigt, sollte die DSB-Reparatur von G1- und G2-Zellen in An- und Abwesenheit von Aphidicolin untersucht werden.

Um den Einfluss von Aphidicolin auf die Reparatur von DNA-DSBs zu untersuchen, wurden die Zellen nach Bestrahlung mit bzw. ohne Aphidicolin behandelt und das Reparaturverhalten

4. Ergebnisse

der Zellen in der G0-, G1- und der G2-Phase mit Hilfe der γ H2AX-Immunfluoreszenzmikroskopie analysiert. Nach dem Auftreten eines DSBs wird das Histon H2AX von Proteinkinasen wie z.B. ATM und DNA-PKcs phosphoryliert. Dieses phosphorylierte Histon (γ H2AX) kann mit Hilfe spezifischer Antikörper detektiert werden und lässt sich im Fluoreszenzmikroskop als fluoreszierender Punkt, sogenannter γ H2AX-Focus nachweisen. Die Zahl der γ H2AX-Foci korreliert mit der Anzahl an DSBs in einer Zelle (Rothkamm et al., 2003).

Die Reparatorexperimente mit Aphidicolin wurden mit auf Glasdeckgläschen bestrahlten Zellen durchgeführt. Es konnte nachgewiesen werden, dass auf Glasdeckgläschen bestrahlte Zellen etwa die doppelte Anzahl an DSBs aufweisen wie Zellen, die auf Plastik mit gleicher Dosis bestrahlt wurden (Kegel et al., 2007). Diese zusätzlichen DSBs sind auf Sekundärelektronen zurückzuführen, die durch Bestrahlung des Glasmaterials entstehen. Diese Sekundärelektronen ionisieren die DNA ebenfalls und verursachen DSBs. Die in Reparaturstudien verwendeten Dosen wurden unter Berücksichtigung dieses Deckglaseffekts dargestellt. Die effektive Dosis bei Deckgläschen weicht von derjenigen bei FACS-Experimenten ab.

Zur Versuchsdurchführung wurden exponentiell wachsende WT-Zellen (MRC-5) mit 2 Gy IR bestrahlt, mit bzw. ohne Aphidicolin versetzt, bei 37° C inkubiert und die Reparatur in Intervallen von je 2 h bis zu 8 h nach Bestrahlung verfolgt. Parallel dazu wurden konfluente auf Deckgläschen befindliche Zellen in derselben Weise behandelt. Dieser Ansatz diente als Kontrolle, da in der G0-Phase keine DNA-Synthese stattfindet. Somit sollte Aphidicolin in dieser Phase keinerlei Einfluss auf die DSB-Reparatur haben. Nach Ablauf der Reparaturzeit wurden die Zellen fixiert und mit γ H2AX- und CENP-F-spezifischen Antikörpern angefärbt. Zusätzlich wurde eine Kernfärbung mit DAPI durchgeführt. Die Unterscheidung der G1-, G2- und der S-Phase erfolgte wie bereits beschrieben anhand der γ H2AX- und CENP-F-Färbung (Kapitel 4.1.1.). Im Fluoreszenzmikroskop wurde die Zahl der γ H2AX-Foci pro Zelle quantifiziert. Pro Zellzyklusphase wurden mindestens 40 Zellen ausgewertet, um die durchschnittliche Focizahl in einer Zelle zu bestimmen. Parallel wurden unbestrahlte Proben als Kontrollen ausgewertet. Aufgrund der geringen Focizahl wurden hier mindestens 200 G1- und 60 G2-Zellen ausgezählt. Der in unbestrahlten Proben ermittelte Kontrollwert wurde von der mittleren Focizahl der bestrahlten Proben abgezogen.

4. Ergebnisse

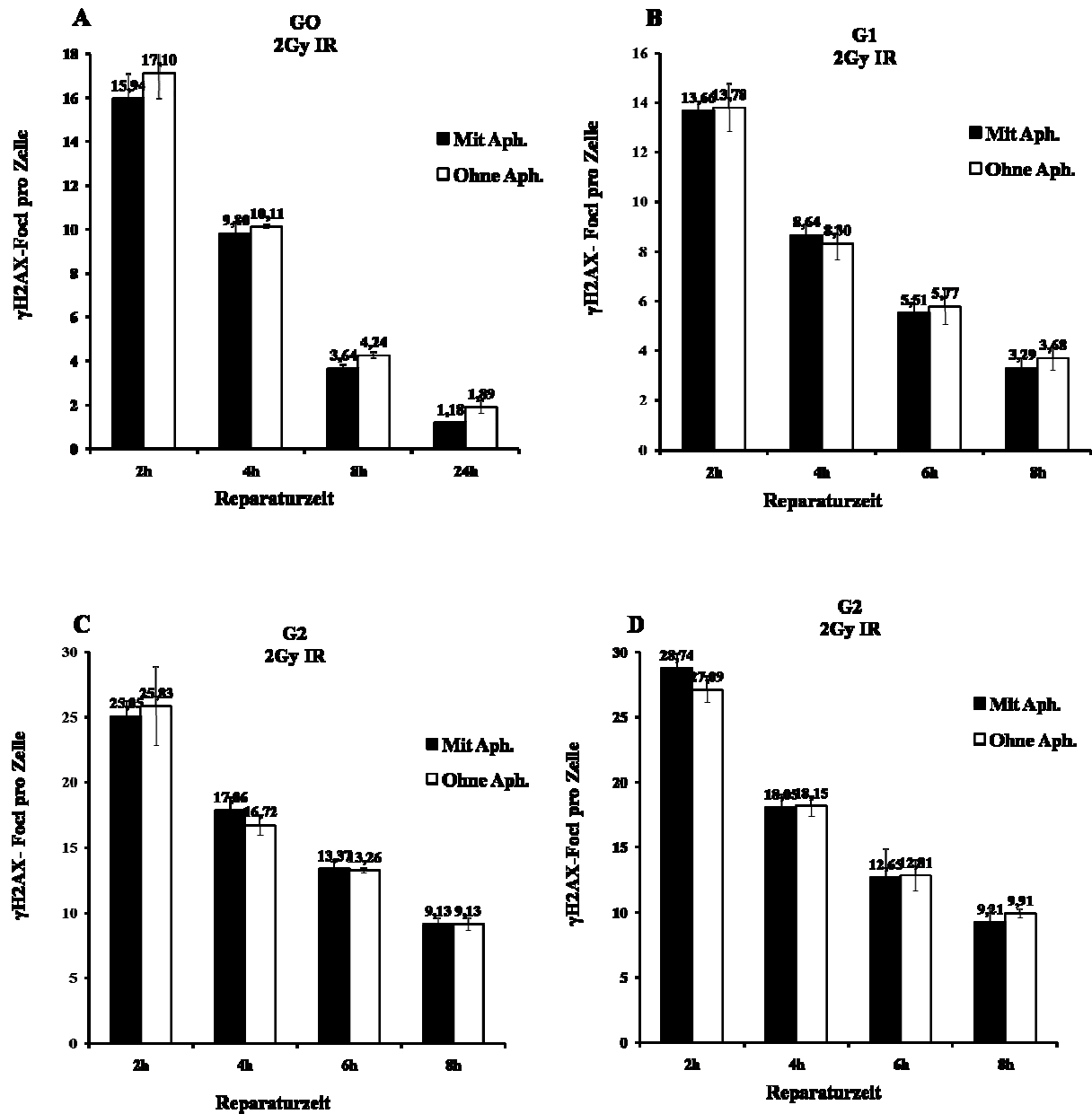


Abb. 4.4. DSB-Reparaturverhalten primärer menschlicher WT-Fibroblasten nach Behandlung mit bzw. ohne Aphidicolin. Aufgetragen ist die Zahl der DSBs in Abhängigkeit der Reparaturzeit **A.** Konfluente menschliche WT-Zellen (durch Kontaktinhibition in der G0-Phase arretiert) wurden mit 2 Gy IR bestrahlt und zur Reparatur bei 37° C inkubiert. 2 h, 4 h, 8 h und 24 h nach Bestrahlung wurden die Zellen fixiert und mit γ H2AX-spezifischem Antikörper angefärbt. Als Kontrolle diente eine unbestrahlte Probe. Der Kontrollwert (0,08 Foci pro Zelle) wurde von den dargestellten Werten abgezogen. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler aus zwei Experimenten dar. **B und C.** Exponentiell wachsende Zellen wurden mit 2 Gy IR bestrahlt und für 2 h, 4 h, 6 h und 8 h bei 37° C zur Reparatur inkubiert. Danach wurden die Zellen fixiert und mit γ H2AX- und CENP-F-spezifischen Antikörpern angefärbt. Die γ H2AX-Foci wurden sowohl in G1- als auch in G2-Zellen quantifiziert. Als Kontrolle diente eine unbestrahlte Probe, deren Werte (0,1 Foci in G1, 4,8 Foci in G2) von den gezeigten Fociwerten abgezogen wurden. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler aus drei unabhängigen Experimenten dar. **D.** Exponentiell wachsende Zellen wurden vor der Bestrahlung 1 h mit BrdU markiert und danach mit 2 Gy IR bestrahlt und für 2 h, 4 h, 6 h und 8 h bei 37° C zur Reparatur inkubiert. Die Zellen wurden anschließend fixiert und mit BrdU-, γ H2AX- und CENP-F-spezifischen Antikörpern angefärbt. Es wurde die Zahl der γ H2AX-Foci pro Zelle in den G2-Zellen ausgewertet. Nur die Zellen, die gleichzeitig CENP-F- positiv und BrdU- negativ waren, wurden in der Analyse in Betracht gezogen. Als Kontrollwert diente eine unbestrahlte Probe, deren Wert in G2 3,1 Foci pro Zelle betrug. Dieser Kontrollwert wurde von den dargestellten Focizahlen abgezogen. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler aus drei unabhängigen Experimenten dar. Die in An- und Abwesenheit von Aphidicolin, 15 min nach Bestrahlung induzierte Focizahl

4. Ergebnisse

wurde nicht dargestellt, da die Zellen zu diesem Zeitpunkt nicht mit Aphidicolin behandelt wurden. Allerdings hat Aphidicolin keinen Einfluss auf die Induktionszahl von DSBs (Beucher et al., 2009). Aph steht in der Abbildung für Aphidicolin.

In der G0-Phase (Abb. 4.4.A) verbleiben 24 h nach Bestrahlung mit 2 Gy IR 1,18 Foci in Aph-behandelten Zellen gegenüber 1,89 Foci in unbehandelten Zellen. Dies zeigt, dass die DSB-Reparatur von WT-Zellen nicht durch Zugabe von Aphidicolin beeinflusst wird. Dieses Ergebnis ist erwartungsgemäß, da Aphidicolin ein Replikationshemmer ist und in G0 keine Replikation stattfindet.

In den G1-Zellen einer exponentiell wachsenden Population (Abb. 4.4 B) verbleiben 8 h nach Bestrahlung 3,3 Foci in Aph-behandelten Zellen. Dagegen sind es 3,7 Foci in unbehandelten Zellen. Auch in der G1-Phase wird die Focizahl durch Aphidicolin nicht erhöht, somit hat Aphidicolin in dieser Phase keinen Einfluss auf die DSB-Reparatur. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit der Tatsache, dass in der G1-Phase keine DNA-Replikation stattfindet, die durch die Anwesenheit von Aphidicolin unterbunden wird.

In der Abb. 3.4.C wurden G2-Zellen ausgewertet. Diese wurden anhand des positiven CENP-F-Signals identifiziert. S-Zellen, die ebenfalls eine schwach-positive CENP-F-Färbung aufweisen, wurden aufgrund des flächigen γ H2AX-Signals (Abb. 4.1.) von der Auswertung ausgeschlossen. In G2-Zellen verbleiben nach 8 h Reparaturzeit 25 Foci in Aph-behandelten Zellen gegenüber 25,8 Foci in unbehandelten Zellen. Das DSB-Reparaturverhalten von WT-Zellen wird auch in der G2-Phase durch die Anwesenheit von Aphidicolin nicht modifiziert. Somit hat Aphidicolin keinen Einfluss auf die DSB-Reparatur in der G2-Phase.

In einem alternativen Ansatz zur Auswertung von G2-Zellen, die sich zur Zeit der Bestrahlung in der G2-Phase befanden, wurden S-Phase-Zellen vor der Bestrahlung mit 2 Gy IR mit BrdU markiert. Die Zelle nimmt BrdU auf und baut es während der DNA-Replikation (in der S-Phase) anstelle des Nukleotids Thymidin in die neusynthetisierte DNA ein. Somit markiert BrdU Zellen, die zum Zeitpunkt der Bestrahlung in der S-Phase sind. Mit spezifischen Antikörpern gegen BrdU kann das inkorporierte BrdU und damit eine stattgefunden DNA-Synthese immunfluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen werden. Zur Untersuchung der Reparatur in G2-Zellen wurde eine Dreifachfärbung mit γ H2AX-, CENP-F- und BrdU-spezifischen Antikörpern durchgeführt. Dabei wurden nur die Zellen ausgewertet, die gleichzeitig CENP-F-positiv und BrdU-negativ waren. Dies sind G2-Zellen, die sich zum Zeitpunkt der Bestrahlung bereits in der G2-Phase befanden. Zellen, die dagegen eine positive CENP-F- und eine positive BrdU-Färbung aufweisen, repräsentieren diejenigen, die zum

4. Ergebnisse

Zeitpunkt der Bestrahlung in der S-Phase waren und während der Reparaturzeit in die G2-Phase eingetreten sind. Solche Zellen werden von der Auswertung ausgeschlossen, da sie sich zum Zeitpunkt nicht in der G2-Phase befanden. Mit diesem Ansatz werden Zellen identifiziert, die während der Bestrahlung und der anschließenden Reparatur in der G2-Phase waren. Somit kann auf die Verwendung von Aphidicolin verzichtet werden. Das Ergebnis der Dreifachfärbung ist in der Abb. 4.4.D dargestellt. In den ausgewerteten BrdU-negativen G2-Zellen bleiben 8 h nach Bestrahlung 9,21 Foci in Aph-behandelten Zellen gegenüber 9,91 Foci in unbehandelten Zellen. Auch in diesem alternativen Ansatz hat Aphidicolin keinen Einfluss auf die DSB-Reparatur in der G2-Phase.

Diese Kontrollexperimente weisen keinen Unterschied in der DSB-Reparatur von G0-, G1- und G2-Zellen in der Ab- bzw. Anwesenheit des Polymeraseinhibitors Aphidicolin nach. Somit kann gezeigt werden, dass Aphidicolin sowohl in der G0/G1-Phase als auch in der G2-Phase keine Auswirkung auf die Reparatur von DSBs hat. Somit kann in den nachfolgenden Experimenten Aphidicolin eingesetzt werden, um die Progression von Zellen aus der S- in die G2-Phase zu unterbinden.

In den in Abb. 4.4. dargestellten Reparaturkinetiken von menschlichen WT-Zellen werden γ H2AX-Foci als Marker für DSBs verwendet. Um auszuschließen, dass γ H2AX-Foci auch andere DNA-Schäden markieren, wurden Reparaturkinetiken mit anderen focibildenden Proteinen, die wie γ H2AX nach dem Auftreten eines DSBs phosphoryliert werden, untersucht.

4.2.3. Phosphoryliertes ATM als Marker für strahleninduzierte DSBs

Die γ H2AX-Immunfluoreszenzmikroskopie ist eine etablierte und sehr sensitive Methode zur Messung von DSBs in der Zelle. Die in Abb. 4.4. erkennbare Abnahme der γ H2AX-Foci-Anzahl über die Zeit korreliert mit der Reparatur von DSBs und erlaubt eine Aussage über Verlauf und Effizienz der Reparatur (Riballo et al., 2004; Deckbar et al., 2007; Beucher et al., 2009). Allerdings beruht diese Methode auf dem indirekten Nachweis von am Schadensort modifizierten Histonproteinen und zeigt DSBs nicht direkt an.

Ionisierende Strahlung verursacht neben DSBs auch Einzelstrangbrüche und Interstrang-Crosslinks. Um auszuschließen, dass diese ebenfalls eine H2AX-Phosphorylierung verursachen und somit die Ergebnisse der DSB-Reparaturanalyse verfälschen, wurde ein weiterer spezifischer Marker für strahleninduzierte DSBs untersucht. Nach dem Auftreten eines DSBs in der Zelle wird ATM durch Autophosphorylierung am Serin 1981 aktiviert

4. Ergebnisse

(Bakkenist und Kastan, 2003; You et al., 2007). Diese Phosphorylierung kann von einem spezifischen Antikörper detektiert werden und lässt sich als phosphoATM-Foci im Fluoreszenzmikroskop nachweisen. ATM wird hauptsächlich durch das Auftreten von DSBs aktiviert (Lee und Paull, 2005; Burma et al., 2001; Helt et al., 2005).

Zunächst wurde die Kolokalisation von γ H2AX-Foci mit phosphoATM-Foci im Fluoreszenzmikroskop untersucht. Dafür wurden primäre menschliche Fibroblasten mit 2 Gy IR bestrahlt, mit Aphidicolin versetzt, nach 8 h fixiert und mit γ H2AX- und phosphoATM-spezifischen Antikörpern angefärbt. Die Zellen wurden mit DAPI gegengefärbt (Abb. 4.5.).

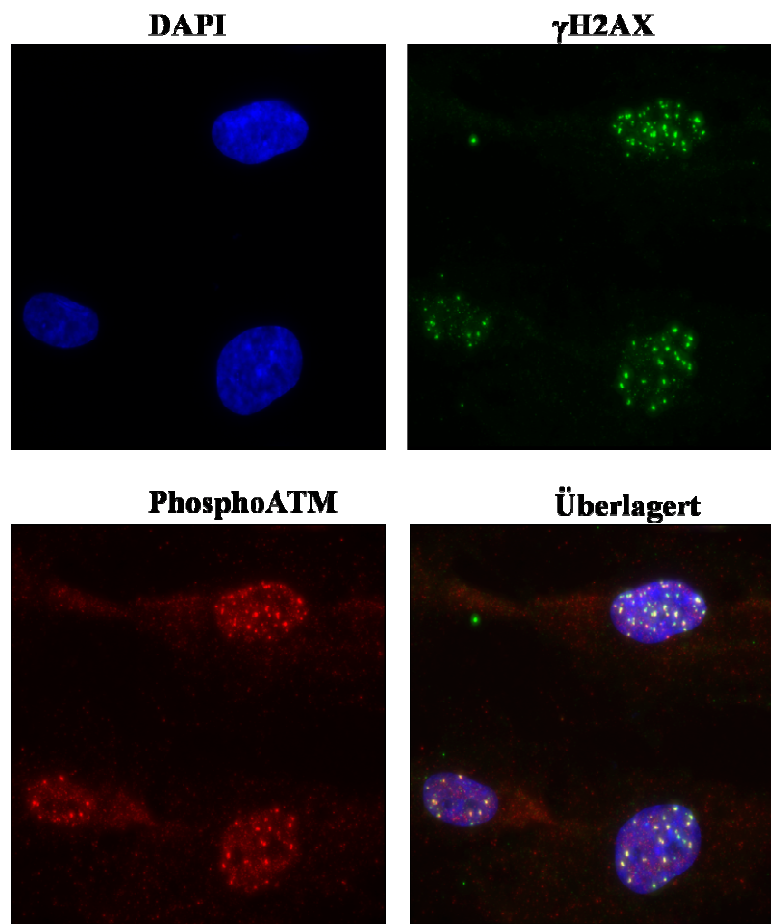


Abb. 4.5. γ H2AX- und phosphoATM-Foci kolokolisieren am Ort des DSBs. Exponentiell wachsende Zellen (HSF-1) wurden mit 2 Gy IR bestrahlt und nach 8 h Inkubation bei 37° C fixiert. Die Zellen wurden mit γ H2AX (grün)- und phosphoATM (rot)-spezifischen Antikörpern angefärbt. Die Bildaufnahme erfolgte bei 1000facher Vergrößerung.

In der γ H2AX- bzw. phosphoATM-Färbung sind deutliche Foci zu erkennen (Abb. 4.5.). Die Überlagerung der Signale zeigt die Kolokalisation von γ H2AX- und phosphoATM-

4. Ergebnisse

spezifischen Foci. Dies bestätigt, dass γ H2AX-Foci unter den verwendeten Versuchsbedingungen strahleninduzierte DSBs markieren.

Um diesen Befund zu untermauern, wurden exponentiell wachsende WT-Zellen mit 2 Gy IR bestrahlt und bis zur Fixierung bei 37° C zur Reparatur inkubiert. Danach wurden die Zellen mit γ H2AX- und CENP-F-spezifischen Antikörpern bzw. phosphoATM- und CENP-F-Antikörpern angefärbt. Die Auszählung der γ H2AX- und phosphoATM-Foci erfolgte unter dem Fluoreszenzmikroskop (Abb. 4.6.).

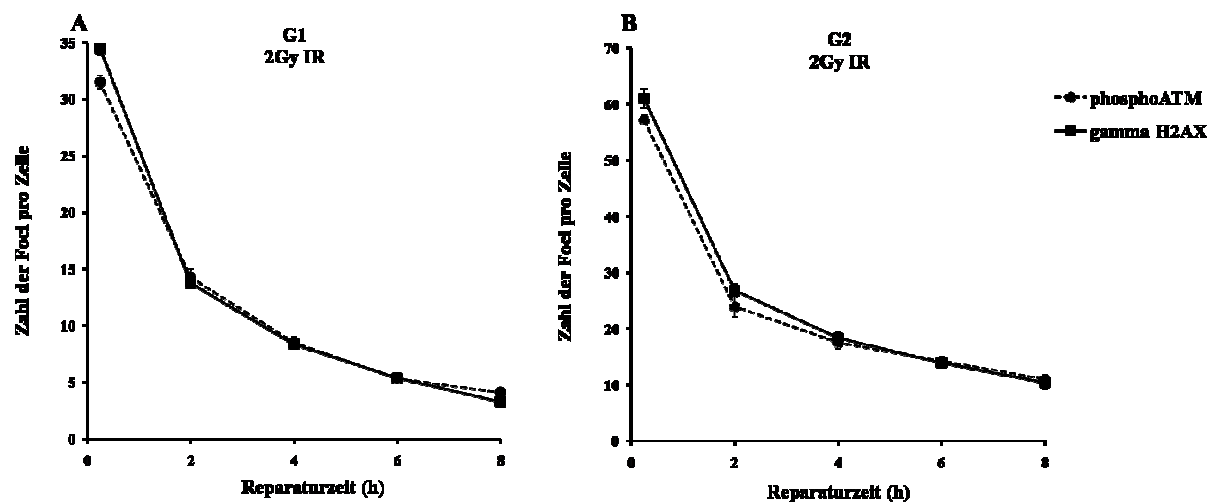


Abb. 4.6. Vergleich des DSB-Reparaturverlaufs von WT-Zellen (HSF-1) in der G1 (A)- und G2 (B)-Phase nach Auswertung von γ H2AX- und phosphoATM-Foci. Exponentiell wachsende Zellen wurden mit 2 Gy IR bestrahlt und danach mit Aphidicolin bei 37° C zur Reparatur inkubiert. 15 min, 2 h, 4 h, 6 h und 8 h nach Bestrahlung wurden die Zellen fixiert und mit γ H2AX- und CENP-F-spezifischen Antikörpern bzw. phosphoATM- und CENP-F-spezifischen Antikörpern angefärbt. Die angefärbten Zellen wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop bei 1000facher Vergrößerung ausgewertet. Dabei wurde die mittlere γ H2AX- und phosphoATM-Focizahl pro Zelle ermittelt. Als Kontrollen wurden unbestrahlte Proben mitgeführt. Die Focidaten stellen die Werte nach Abzug der entsprechenden Kontrollwerte (0,2 γ H2AX- bzw. 0,08 phosphoATM-Foci pro Zelle in G1, 4 γ H2AX- bzw. 2,18 phosphoATM-Foci pro Zelle in G2) dar. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler aus mindestens drei Experimenten.

In der G1-Phase (Abb. 4.6.A) werden 15 min nach Bestrahlung mit 2 Gy IR 34,50 γ H2AX-Foci in WT-Zellen induziert, 8 h nach Bestrahlung verbleiben 3,28 γ H2AX-Foci. Von den 31,50 induzierten phosphoATM-Foci in WT-Zellen, bleiben 8 h nach Bestrahlung 4,11 Foci erhalten. Der Verlauf beider Reparaturkinetiken ist in der G1-Phase fast identisch, mindestens 85 % der induzierten DSBs werden beseitigt.

In der G2-Phase (Abb. 4.6.B) werden durch 2 Gy Röntgenstrahlung 61 γ H2AX-Foci in WT-Zellen induziert. Nach 8 h Reparaturzeit sind noch 10,43 von den induzierten γ H2AX-Foci vorhanden. Von den 57,26 induzierten phosphoATM-Foci verbleiben 8 h nach Bestrahlung

4. Ergebnisse

11,01 phosphoATM-Foci. Der Verlauf beider Reparaturkinetiken ist auch in der G2-Phase nahezu identisch, hier werden mindestens 80 % der DSBs beseitigt.

Sowohl in der G1- als auch G2-Phase liegt die Induktion der phosphoATM-Foci im Vergleich zu der von γ H2AX-Foci etwas niedriger (Abb. 4.6). Die Erklärung dafür liegt in dem schwachen Fluoreszenzsignal der phosphoATM-Foci in den ersten Minuten nach Bestrahlung, so dass vermutlich nicht alle fluoreszierenden Foci erfasst werden können.

Die Ergebnisse der Abb. 4.6. zeigen, dass sich die γ H2AX- und phosphoATM-Reparaturkurven sowohl in der G1- als auch G2-Phase fast überlagern. Somit sind beide Proteine als DSB-Marker geeignet.

Mit Hilfe von zellzyklusspezifischen Markern wie CENP-F und phosphoH3 können die Zellzyklusphasen eindeutig unterschieden werden. Somit kann die DSB-Reparaturanalyse sowohl in der G1- als auch G2-Phase durchgeführt werden. Die durchgeführten Vorexperimente haben gezeigt, dass Aphidicolin die Progression der S-Zellen in der G2-Phase verhindert, ohne dabei zusätzliche DSBs in der G1- und G2-Phase zu verursachen. Die DSB-Reparaturanalyse in der G1- und besonders G2-Phase kann bei einer Dosis von 2 Gy bis 8 h nach Bestrahlung durchgeführt werden. Zudem kann gezeigt werden, dass γ H2AX-Foci unter den gewählten Versuchsbedingungen strahleninduzierte DSBs markieren. Auf der Basis dieser Vorkenntnisse wurde die DSB-Reparatur von ATM- und Artemis-defizienten Zellen in der G1- und G2-Phase durchgeführt.

4.3. DSB-Reparatur von ATM- und Artemis-defizienten Zelllinien

ATM ist eine Proteinkinase, die eine zentrale Rolle in der DSB-Schadensantwort spielt. Beim Eintritt eines DSBs wird ATM durch den MRN-Komplex aktiviert und zum Ort des DSBs rekrutiert (Lee und Paull, 2005; Dupre et al., 2006). ATM wird an Serin 1981 autophosphoryliert und phosphoryliert anschließend eine Reihe an Proteinen, die an der Checkpoint-Signalkaskade beteiligt sind, wie p53 und Chk2 (Lombard et al., 2005; O'Driscoll und Jeggo, 2006), und mehrere Reparaturproteine, unter anderem MDC-1, 53BP1, H2AX und Artemis (Jankovic et al., 2007). Artemis ist eine Nuklease und übernimmt eine wichtige Rolle in der V(D)J-Rekombination, indem es die Haarnadelstrukturen auflöst, die während dieses Prozesses entstehen. Zusätzlich konnte die Beteiligung dieses Proteins an der Reparatur bestimmter DSBs, die möglicherweise vor der Ligation prozessiert werden müssen, gezeigt werden (Moshous et al., 2001; Riballo et al., 2004).

4. Ergebnisse

In diesen Studien wurde ein kleiner, aber signifikanter Reparaturdefekt von ähnlichem Verlauf und Ausmaß in ATM- und Artemis-defizienten Zelllinien in der G0-Phase nachgewiesen (Riballo et al., 2004). 10 % der DSBs blieben in ATM- und Artemis-defizienten Zellen unrepariert. Das zusätzliche Ausschalten von ATM durch ein hochspezifisches Inhibitormolekül (Hickson et al., 2004) vergrößerte den Reparaturdefekt in Artemis-defizienten Zellen nicht (Riballo et al., 2004). Beide Proteine sind epistatisch und arbeiten in der G0-Phase in einem gemeinsamen Reparaturweg (Riballo et al., 2004). Artemis wird von ATM *in vitro* phosphoryliert (Riballo et al., 2004). Daraus wurde geschlussfolgert, dass ATM *upstream* von Artemis agiert. Jedoch könnte es Unterschiede im Ablauf der zellulären Prozesse in ruhenden Zellen in der G0-Phase im Vergleich zu aktiv wachsenden Zellen, die den Zellzyklus durchlaufen, geben. Um dieser Frage nachzugehen, wurden exponentiell wachsende Zellen in der G1- und G2-Phase untersucht.

Zunächst wurden primäre menschliche Fibroblasten verwendet. Diese Zellen stammen aus Patienten mit Syndromen, die mit einer defekten DSB-Reparatur im Zusammenhang gebracht werden. Diese Zellen sind somit nicht transformiert, stellen jedoch nach einer begrenzten Anzahl an Zellteilungen die Teilungsaktivität ein. Außerdem steht aufgrund der embryonalen Letalität, die häufig mit Defekten in der DNA-Schadensantwort einhergeht, nur eine begrenzte Anzahl an defizienten Zelllinien zur Verfügung.

4.3.1. DSB-Reparatur von ATM- und Artemis-defizienten primären menschlichen Fibroblasten

Um die Abhängigkeit der DSB-Reparatur exponentiell wachsender Zellen von ATM und Artemis zu untersuchen, wurden zunächst exponentiell wachsende primäre humane Fibroblasten mit Defizienzen in Artemis (CJ179 und F01-240) bzw. ATM (AT7Bi und AT1Br) im Vergleich zu WT-Zellen (MRC-5 und HSF-1) analysiert. Die Versuchsdurchführung erfolgte wie im Kapitel 4.2.2. beschrieben.

4. Ergebnisse

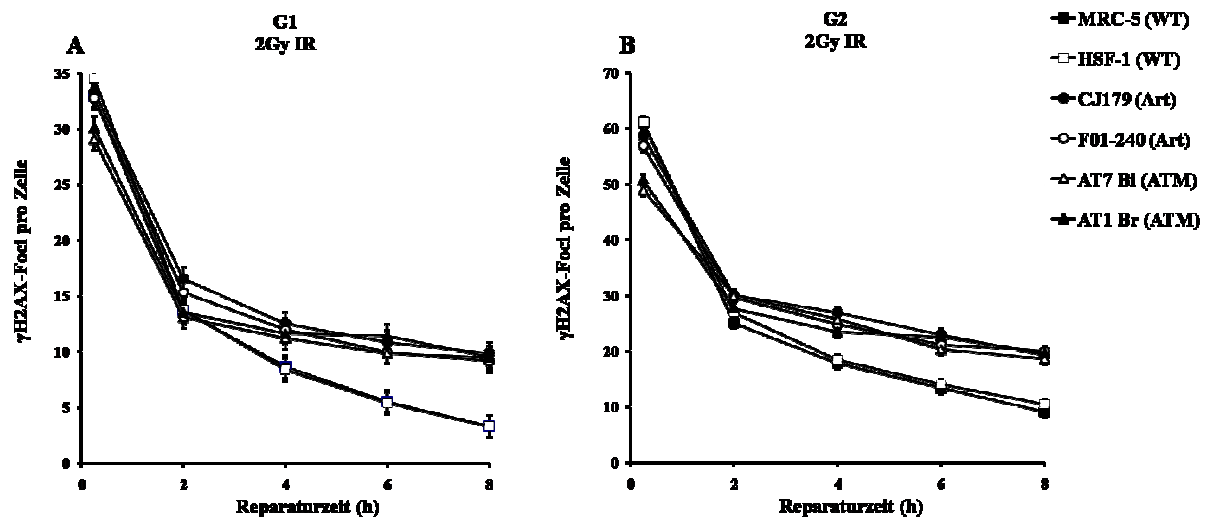


Abb. 4.7. DSB-Reparatur von Artemis- und ATM-defizienten menschlichen Fibroblasten in der G1 (A)- und G2 (B)-Phase. Exponentiell wachsende Zellen wurden mit 2 Gy IR bestrahlt und bei 37° C für 15 min, 2 h, 4 h, 6 h und 8 h zur Reparatur inkubiert. Danach wurden die Zellen fixiert und mit spezifischen γ H2AX- und CENP-F-Antikörpern angefärbt. Die Auszählung der Foci erfolgte unter dem Fluoreszenzmikroskop. Die in unbestrahlten Proben ermittelten Kontrollwerte (0,2-0,5 Foci in G1, 4-5 Foci in G2) wurden von den dargestellten Fociwerten abgezogen. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler aus mindestens vier Experimenten dar.

Der Verlauf der DSB-Reparatur ist in beiden untersuchten WT-Zelllinien in der G1-Phase nahezu identisch (Abb. 4.7.A). Von den 34 induzierten DSBs nach Bestrahlung mit 2 Gy IR werden bei beiden Zelllinien etwa 90 % der DSBs innerhalb von 8 h repariert, sodass noch 3,3 DSBs nachgewiesen werden. Die Induktionswerte von ATM-defizienten Zellen (AT1Br und AT7Bi) liegen sowohl in der G1- als auch G2-Phase niedriger als bei WT (MRC-5 und HSF-1)- und Artemis-defizienten (CJ179 und F01-240)-Zellen (Abb. 4.7.). Dies ist auf die Bedeutung von ATM für die frühe Phosphorylierung von H2AX zurückzuführen. Innerhalb der ersten 3 min nach Eintritt des DSBs wird H2AX in der Umgebung des DSBs phosphoryliert (Rogakou et al., 1999) und wird als Focus im Fluoreszenzmikroskop sichtbar. In der Abwesenheit von ATM wird diese H2AX-Phosphorylierung von DNA-PKcs übernommen (Riballo et al., 2004). Allerdings sind die so ausgebildeten γ H2AX-Foci sehr fein, und das Fluoreszenz-Signal ist schwach. Aus diesen Gründen wird die Induktion in ATM-defizienten Zellen vermutlich unterschätzt, deshalb wird die Reparatureffizienz von ATM-defizienten Zellen auf die Induktionswerte der WT-Zellen normiert. In ATM-defizienten Zelllinien werden in der G1-Phase 29,5 DSBs induziert, von denen 9,5 DSBs unrepariert bleiben (Abb. 4.7.A). Dies entspricht nach Normierung auf die Induktionswerte von WT-Zellen einer Reparatureffizienz von 71 %. In Artemis-defizienten Zelllinien werden durch Bestrahlung mit 2 Gy IR 33 DSBs verursacht. Davon verbleiben 9,5 DSBs in der G1-Phase (Abb. 4.7.A), es werden 71 % der DSBs beseitigt. In der G1-Phase zeigen somit ATM-

4. Ergebnisse

und Artemis-defiziente Zelllinien einen kleinen Reparaturdefekt von identischem Ausmaß. Es bleiben bis zu 19 % der strahleninduzierten DSBs gegenüber WT-Zellen unrepariert.

Auch in der G2-Phase zeigen die WT-Zelllinien ein nahezu identisches Reparaturverhalten (Abb. 4.7.B). Von den 61 induzierten DSBs nach Bestrahlung mit 2 Gy IR verbleiben noch 9,8 DSBs, somit werden 84 % der DSBs repariert. 49 DSBs werden in ATM-defizienten Zelllinien 15 min nach Bestrahlung ermittelt, von denen 19 DSBs erhalten bleiben. Normiert auf den Induktionswert der WT-Zellen beträgt die Reparaturkapazität 69 %. In Artemis-defizienten Zelllinien werden 57 strahleninduzierten DSBs ausgezählt, von denen 19,5 DSBs verbleiben. Dies entspricht einer Reparaturreffizienz von 66 % (Abb. 4.7.B). Auch in der G2-Phase ist ein kleiner und sehr ähnlicher Reparaturdefekt von etwa 15-18 % bei ATM- und Artemis-Mutanten im Vergleich zu WT-Zellen zu beobachten.

Somit konnte gezeigt werden, dass ATM- und Artemis-defiziente primäre menschliche Fibroblasten sowohl in der G1- als auch G2-Phase einen kleinen und ähnlichen Reparaturdefekt gegenüber WT-Zelllinien aufweisen. Dieser Reparaturdefekt wird erst 4 h nach Bestrahlung sichtbar und wird mit zunehmender Reparaturzeit deutlicher. Der identische Reparaturdefekt von beiden Mutanten wurde bereits in der G0-Phase beobachtet (Riballo et al., 2004) und führte zu der Vermutung, dass ATM und Artemis in der G0-Phase am gleichen Reparaturweg beteiligt sind. Das unveränderte Reparaturverhalten von Artemis-defizienten Zellen nach zusätzlicher Inhibition von ATM bestätigte diese Vermutung in der G0-Phase (Riballo et al., 2004). Um diesen Befund auch in der G1- und der G2-Phase zu analysieren, wurden ATM und Artemis alleine und in Kombination in HeLa-Zellen herunterreguliert. HeLa-Zellen bieten den Vorteil, dass sie sich mit siRNA leicht transfizieren lassen. Mit der siRNA-Technologie können Proteine gezielt unterdrückt werden. Dieser Ansatz bietet den Vorteil, dass die Untersuchungen in derselben Zelllinie und damit vor demselben genetischen Hintergrund durchgeführt werden können. Außerdem kann so ausgeschlossen werden, dass die beobachteten Reparaturdefekte zelltypabhängig sind und nur in den bisher untersuchten Hautfibroblasten auftreten.

4.3.2. DSB-Reparatur von ATM- und Artemis-depletierten HeLa-Zellen

Die Beobachtung, dass ATM- und Artemis-Mutanten einen kleinen und ähnlichen Reparaturdefekt in der G1- und G2-Phase aufwiesen, führte zu der Vermutung, dass beide Proteine epistatisch zueinander in G1 und G2 sind. Durch Epistasis Studien könnte untersucht werden, ob zwei Reparaturproteine A und B über einen gleichen Reparaturweg zusammenwirken oder ob sie an unterschiedlichen Reparaturwegen beteiligt sind. Durch die Mutation oder die chemische Inhibition der Reparaturproteine A oder B wird deren

4. Ergebnisse

Funktionalität beeinträchtigt, und es kommt zu einem Reparaturdefekt in der betroffenen Zelle. Angenommen, beide Reparaturproteine A und B gehören zu einem gemeinsamen Reparaturweg, sollte die doppelte Unterdrückung beider Proteine zu keiner Vergrößerung des Reparaturdefekts führen, da dieser gemeinsame Reparaturweg durch die einzelne Proteininaktivierung bereits beschädigt ist. In diesem Fall sind beide Proteine A und B zueinander epistatisch. Falls jedoch die doppelte Depletion eine Vergrößerung des Reparaturdefekts verglichen zu den einzelnen Reparaturdefekten verursacht, kann angenommen werden, dass beide Proteine über unterschiedliche Wege wirken.

Um zu untersuchen, ob ATM und Artemis epistatisch zueinander sind, wurden in HeLa-Zellen ATM und Artemis alleine und in Kombination mittels siRNA herunterreguliert. Zur Versuchsdurchführung wurden HeLa-Zellen mit Artemis- und ATM-siRNA transfiziert. Die maximale Inaktivierung von ATM und Artemis wurde im Westernblot 48 h nach der Transfektion beobachtet (Olivia Barton, mündliche Mitteilung). Daher wurde nach Ablauf dieser Inkubationszeit mit 2 Gy IR bestrahlt. Nach der Bestrahlung wurden die Zellen bis zur Fixierung bei 37° C zur Reparatur weiter inkubiert. Die Antikörperfärbung und die Probenauswertung erfolgten analog zu den vorherigen Experimenten (Kapitel 4.2.2.). Ähnlich wie bei primären menschlichen Fibroblasten (Abb. 4.3.A) gab es 8 h nach Bestrahlung immer noch genügend G2-Zellen auszuwerten.

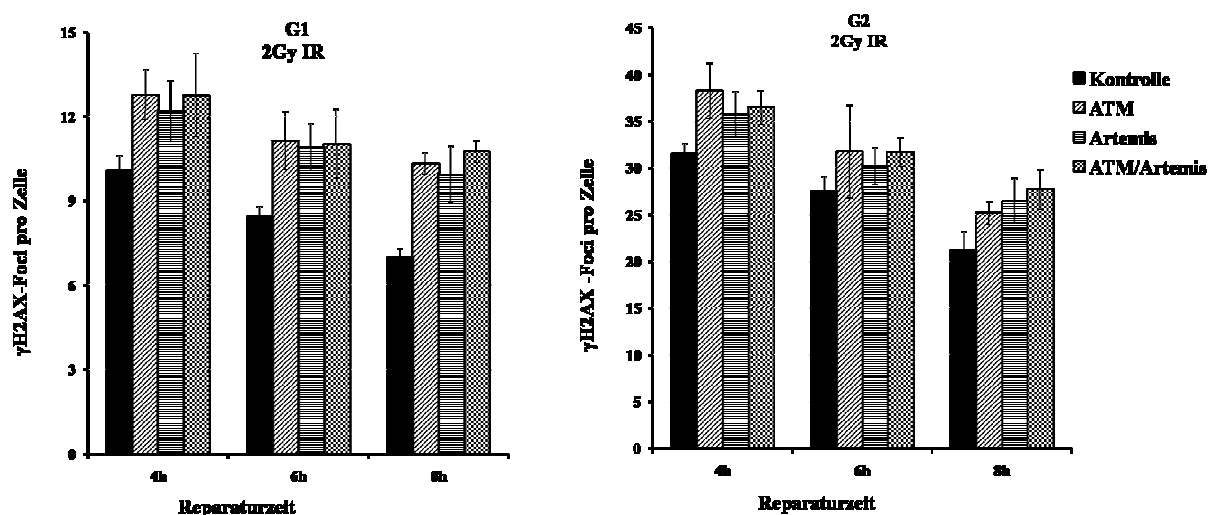


Abb. 4.8. DSB-Reparatur von HeLa-Zellen nach transienter Unterdrückung von ATM und Artemis in G1 (A) und G2 (B). Exponentiell wachsende HeLa-Zellen wurden mit ATM- bzw. Artemis-siRNA transfiziert, nach 48 h mit 2 Gy IR bestrahlt und bei 37° C zur Reparatur inkubiert. Nach 4 h, 6 h und 8 h wurden die Zellen fixiert und mit γ H2AX- und CENP-F-spezifischen Antikörpern angefärbt. Die Auszählung der γ H2AX-Foci erfolgte bei 1000facher Vergrößerung in der G1- und in der G2-Phase. Parallel wurden Zellen mit Kontroll-siRNA und ATM-/Artemis-Doppel-siRNA transfiziert. Die in unbestrahlten Proben ermittelten Kontrollwerte

4. Ergebnisse

(0,2-0,5 in G1, 4-6 in G2) wurden von den dargestellten Fociwerten abgezogen. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler von drei unabhängigen Experimenten dar.

In der G1-Phase (Abb. 4.8.A) verbleiben in Kontroll-siRNA-behandelten Zellen nach Bestrahlung mit 2 Gy IR 7 DSBs. ATM- und Artemis-depletierte Zellen lassen nach 8 h Reparatur durchschnittlich 10 DSBs unrepariert. Die Depletion von ATM und Artemis führt zu einer Verschlechterung der DSB-Reparatur um etwa 3 DSBs im Vergleich zu Kontrollzellen. Somit führt die Inaktivierung von ATM und Artemis in HeLa-Zellen zu einem kleinen und identischen Reparaturdefekt. In HeLa-Zellen, in denen ATM und Artemis gleichzeitig herunterreguliert wurde, bleiben 8 h nach Behandlung 10,7 DSBs erhalten. Somit führt die kombinierte Proteininaktivierung in HeLa-Zellen in der G1-Phase auch zu einem kleinen Reparaturdefekt gegenüber Kontrollzellen. Dieser Reparaturdefekt zeigt nahezu identisches Ausmaß wie der, der in ATM- und Artemis-depletierten Zellen beobachtet wird. Der Reparaturdefekt wurde durch die kombinierte Proteininaktivierung nicht vergrößert. Dies deutet darauf hin, dass ATM und Artemis am gleichen Reparaturweg beteiligt sind. Wären beide Proteine an unterschiedlichen Reparaturwegen beteiligt, würde nach der kombinierten Proteininaktivierung ein vergrößerter Reparaturdefekt beobachtet, der sich aus den einzelnen ATM- und Artemis-Reparaturdefekten ergäbe.

In der G2-Phase (Abb. 4.8.B) verbleiben in Kontrollzellen 21,3 DSBs. In ATM-depletierten Zellen sind noch 25,2 DSBs vorhanden. Die Artemis-depletierten Zellen lassen nach einer Reparaturzeit von 8 h 26,4 DSBs unrepariert. Auch in der G2-Phase führt die Herunterregulation von ATM und Artemis zu einer Verschlechterung der DSB-Reparatur. In ATM- bzw. Artemis-depletierten Zellen bleiben im Vergleich zu Kontrollzellen 4-5 DSBs unrepariert. Nach der kombinierten Herunterregulation von ATM und Artemis verbleiben 27,7 DSBs. Dies entspricht einer Differenz von 6 DSBs im Vergleich zu Kontrollzellen. Im Vergleich zur Reparatur nach alleiniger Herunterregulation von ATM bzw. Artemis ist somit keine maßgebliche Verschlechterung der Reparaturkapazität erkennbar. Dies deutet darauf hin, dass auch in der G2-Phase ATM und Artemis an einem gemeinsamen Reparaturweg beteiligt sind.

4.3.3. DSB-Reparatur von MDC-1-, 53BP1-, ATM- und Artemis-defizienten MEFs

Um zu untersuchen, ob außer Artemis andere Proteine an dem ATM-Reparaturweg beteiligt sind, soll das Reparaturverhalten von Zelllinien mit Defizienzen in anderen ATM-Substraten untersucht werden. Geeignete Kandidaten sind die Proteine 53BP1 und MDC-1. 53BP1 und MDC-1 werden durch ATM phosphoryliert und sind außerdem beschrieben an der DNA-

4. Ergebnisse

Schadensantwort beteiligt zu sein. So wurde gezeigt, dass 53BP1 in G0 am ATM/Artemis-Reparaturweg beteiligt ist (Riballo et al., 2004). Der beobachtete 53BP1-Reparaturdefekt in der 53BP1-Mutante war vergleichbar zu dem von Artemis- und ATM-Mutanten. Allerdings könnten die zellulären Reparaturvorgänge in der G0- anders als in der G1- und G2-Phase ablaufen. Deswegen soll das Reparaturverhalten von 53BP1-defizienten Zellen in der G1- und G2-Phase analysiert werden. MDC-1 interagiert mit ATM und γ H2AX, die beide eine wichtige Rolle in der DSB-Reparatur übernehmen. Um die mögliche Beteiligung von MDC-1 an der DSB-Reparatur zu untersuchen, soll auch das Reparaturverhalten von MDC-1-defizienten Zellen analysiert werden.

MDC-1 bindet an γ H2AX und rekrutiert aktiviertes ATM an den Schadensort (Stucki et al., 2005; Lou et al., 2006). Der Verlust von MDC-1 beeinträchtigt die zelluläre Antwort auf DSBs, einschließlich der Regulation von intra S- und G2/M-Checkpoints und IR-induzierter Apoptose (Stewart et al., 2003; Goldberg et al., 2003). MDC-1 wird von ATM phosphoryliert (Kolas et al., 2007) und ist für die Akkumulation weiterer an der Schadensantwort beteiligter Proteine wie BRCA1 und 53BP1 notwendig (Lou et al., 2003; Goldberg et al., 2003; Bekker-Jensen et al., 2005). Obwohl MDC-1 für die Verstärkung des ATM-abhängigen Schadenssignals verantwortlich ist (Lou et al., 2006), mit Rad51 interagiert und dadurch die HR erleichtert (Zhang et al., 2005), ist eine eindeutige Rolle in der DSB-Reparatur, insbesondere im NHEJ bisher nicht nachgewiesen worden.

53BP1 wird ebenfalls von ATM phosphoryliert und kolokalisiert an den Schadensort mit anderen focibildenden Proteinen (Anderson et al., 2001; Rappold et al., 2001). 53BP1 ist für die optimale, durch DNA-Schaden induzierte Phosphorylierung von ATM-Substraten wie SMC1, BRCA1 und Chk2 erforderlich (Wang et al., 2002; DiTullio et al., 2002; Ward et al., 2003). Studien haben gezeigt, dass 53BP1-defiziente Zellen nur bei niedrigen Strahlungsdosen einen leichten intra S-Checkpoint- und einen nahezu dreifachen G2/M-Checkpointdefekt haben (Wang et al., 2002; DiTullio et al., 2002). Diese Beobachtungen geben einen Hinweis darauf, dass 53BP1 die DNA-Schadensantwort durch Erleichterung der ATM-Aktivität vermittelt. Vermutlich ist 53BP1 für die Aktivierung von ATM notwendig (Mochan et al., 2004; DiTullio et al., 2002). Obwohl 53BP1 mit Rad51-Paralogen wie Rad51A und Rad51C an durch die selten schneidende Endonuklease I-SceI-induzierten DSBs kolokalisiert (Rodrigue et al., 2006), ist seine Beteiligung an der HR bisher nicht eindeutig nachgewiesen worden (Ward et al., 2004). Dagegen ist jedoch die Beteiligung von 53BP1 am NHEJ in der G0-Phase bereits beschrieben worden (Riballo et al., 2004).

4. Ergebnisse

Das Zusammenspiel zwischen ATM und MDC-1 bzw. ATM und 53BP1 lässt jedoch vermuten, dass beide Proteine auch eine Rolle in der DSB-Reparatur und nicht nur in der Checkpoint-Erhaltung übernehmen. Um diese Hypothese näher zu untersuchen, wurde das DSB-Reparaturverhalten von MDC-1 und 53BP1-defizienten Zellen analysiert. Dabei sollte das Ausmaß von MDC-1- und 53BP1-Defizienzen auch mit demjenigen von ATM- und Artemis-defizienten Zellen verglichen werden.

Die DSB-Reparaturanalyse wurde in WT- und MDC-1-, 53BP1-, ATM- und Artemis-defizienten murinen embryonalen Fibroblasten (MEFs) durchgeführt. Vorteil dieses Systems ist, dass die untersuchten Zelllinien *knockout*-Mutanten sind, d.h. die Expression der Reparaturproteine ist vollständig inaktiviert. Bei primären menschlichen Fibroblasten und mit der siRNA-Technologie kann die Möglichkeit einer Restaktivität des zu untersuchenden Reparaturproteins nicht immer vollständig ausgeschlossen werden. Allerdings wurden die MEFs immortalisiert und verloren nach häufigem Passagieren die Kontaktinhibition und wurden somit transformiert. Diese Transformation führte zu einer Änderung im Chromosomensatz der Zelle, der eine wichtige Grundlage für die Unterscheidung der Zellzyklusphasen ist. Als Konsequenz davon können Zellkerne innerhalb einer Zellpopulation sehr unterschiedliche DNA-Gehalte aufweisen. In der Immunfluoreszenzmikroskopie ließen sich solche Zellen durch ihre anormale Kerngröße und die erhöhte Anzahl an γ H2AX-Foci meist erkennen, jedoch kann die vollständige Ausschließung solcher Zellen nicht immer gewährleistet werden. Daher wurden bei der γ H2AX-Fociauswertung von MEFs im Vergleich zu menschlichen Zelllinien deutlich mehr Zellen gezählt. Da die Anzahl der strahleninduzierten DSBs mit der DNA-Menge korreliert, besteht bei der Auswertung einer zu geringen Anzahl an Zellen die Gefahr, dass die Statistik verfälscht wird.

Zur Versuchsdurchführung wurden exponentiell wachsende MEFs mit 2 Gy bestrahlt und bis zur Fixierung bei 37° C inkubiert. Die Färbung der Zellen erfolgte mit γ H2AX- und phosphoH3-spezifischen Antikörpern. G1- und G2-Zellen ließen sich anhand des PhosphoH3-Musters voneinander unterscheiden (Kapitel 4.1.2.). Ausgewertet wurden mindestens 70 Zellen in beiden Zellzyklusphasen. In unbestrahlten Proben wurden mehr als 200 G1- und 100 G2-Zellen ausgewertet.

4. Ergebnisse

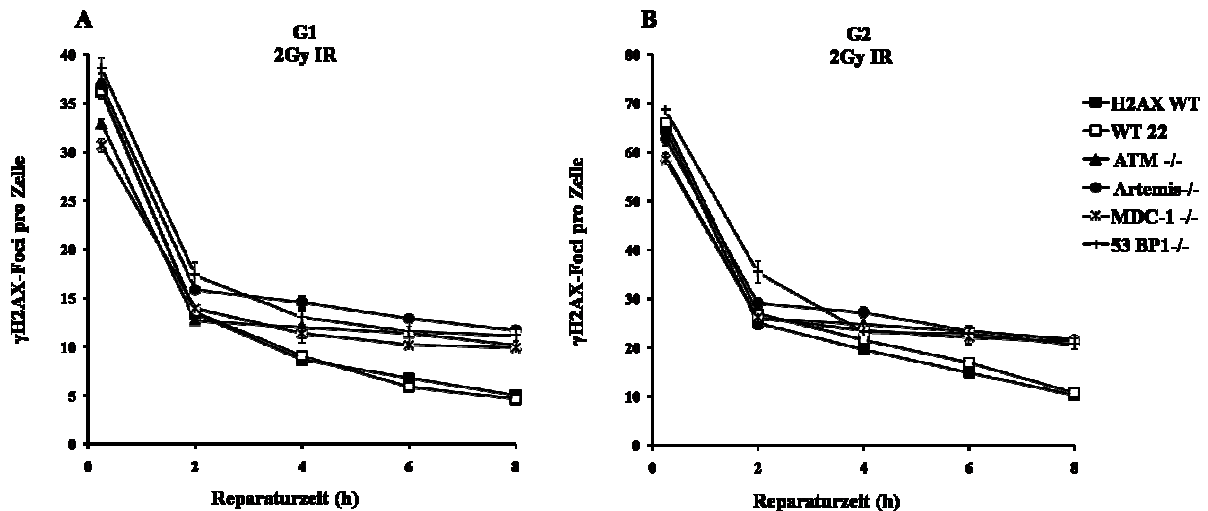


Abb. 4.9. DSB-Reparatur von MDC-1-, 53BP1-, ATM- und Artemis-defizienten MEFs in G1 (A) und G2 (B). Exponentiell wachsende MEFs wurden mit 2 Gy IR bestrahlt und bei 37° C zur Reparatur inkubiert. Nach 15 min, 2 h, 4 h, 6 h und 8 h wurden die Zellen fixiert und mit γ H2AX- und phosphoH3-spezifischen Antikörpern angefärbt. Die Zellkerne wurden mit DAPI gegengefärbt und in der G1- und der G2-Phase ausgewertet. Die Kontrollwerte, die bei MDC-1- und 53BP1-defizienten MEFs 0,2-1 Foci in G1 und 6-10 Foci in G2 betrugen, wurden von den Werten der bestrahlten Zellen abgezogen. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler von mindestens drei Experimenten dar.

In der G1-Phase (Abb. 4.9.A) zeigen die WT-Zelllinien (H2AX WT und WT22) einen nahezu identischen Reparaturverlauf. Von den 36 induzierten DSBs nach Bestrahlung mit 2 Gy IR bleiben 5 DSBs unrepariert, somit werden 86 % der DSBs beseitigt. Die γ H2AX-Foci-Induktionszahl von 33 DSBs in ATM-defizienten MEFs ist, ähnlich wie in ATM-defizienten menschlichen Fibroblasten (Abb. 4.7.), niedriger als diejenige von WT- und Artemis-defizienten MEFs. Dies liegt an dem schwachen Fluoreszenzsignal der ATM-Mutanten unmittelbar nach Bestrahlung (Kap. 4.3.1.). Nach 8 h Reparaturzeit sind noch 10,2 DSBs in ATM-defizienten MEFs vorhanden. Dies entspricht nach Normierung auf den Induktionswert von WT-MEFs einer Reparaturreffizienz von 72 %. In Artemis-defizienten MEFs werden 37 DSBs induziert, und davon verbleiben 11 DSBs, was einer Reparaturreffizienz von 70 % entspricht. Der Induktionswert der MDC-1-Mutante (30,7 DSBs) liegt ähnlich wie der der ATM-Mutante niedriger als bei den anderen untersuchten MEF-Zelllinien. Dies liegt daran, dass MDC-1-defiziente MEFs ein schwaches γ H2AX-Fluoreszenzsignal aufweisen, vermutlich weil MDC-1 eine Rolle in der Verstärkung oder Aufrechterhaltung der H2AX-Phosphorylierung übernimmt (Stucki et al., 2005). Dadurch wird die Auszählung der γ H2AX-Foci erschwert, sodass der Induktionswert vermutlich unterschätzt wird. Deswegen wird die Reparaturreffizienz von MDC-1-defizienten MEFs, ähnlich wie bei ATM-defizienten Zellen, auf die Induktionswerte von WT-Zellen normiert (Kap. 4.3.1.). Dies entspricht somit 72 %. Die Bestrahlung verursacht 38,5 DSBs in der 53BP1-Mutante. Innerhalb von 8 h verbleiben

4. Ergebnisse

11,2 DSBs, sodass 71 % der DSBs repariert werden. In der G1-Phase lassen alle untersuchten Mutanten 14 - 16 % mehr DSBs als WT-Zellen unrepariert, somit weisen sie einen kleinen Reparaturdefekt. Dieser ist bei allen Mutanten nahezu identisch.

Auch in der G2-Phase (Abb. 4.9.B) zeigen beide WT-MEFs einen sehr ähnlichen Verlauf der Reparaturkinetik. Von 65 strahleninduzierten DSBs verbleiben 10 DSBs, somit werden 84 % der DSBs beseitigt. ATM-defiziente MEFs kommen von 59 ausgezählten DSBs auf ein Niveau von 21,7 DSBs. Normiert auf die Induktionswerte von WT-Zellen, entspricht dies einer Reparaturreffizienz von 66,6 %. Diese beträgt in der Artemis-Mutante 66 %, da 21,5 DSBs von den 63 initiierten DSBs erhalten bleiben. In der MDC-1-Mutante werden 15 min nach Bestrahlung 56 DSBs ausgewertet, davon bleiben nach 8 h Reparaturzeit 21,3 DSBs erhalten. Auch in der G2-Phase zeigen MDC-1-defiziente MEFs aufgrund des schwachen Fluoreszenzsignals einen niedrigen Induktionswert. Deswegen wird auch in der G2-Phase dieser Wert auf den von WT-Zellen normiert, somit beträgt die Reparaturreffizienz der MDC-1-Mutante 67 %. Die 53BP1-Mutante beseitigt 69 % der Brüche innerhalb von 8 h, sodass 21 DSBs von anfänglichen 68,5 DSBs verbleiben. Auch in der G2-Phase zeigen alle Mutanten einen kleinen Reparaturdefekt von 15-17 % gegenüber WT-MEFs. Das DSB-Reparaturverhalten der in der Abb. 4.9. untersuchten Mutanten zeigt auch in der G2-Phase große Ähnlichkeiten.

Alle Mutanten weisen im Vergleich zu WT-Zellen sowohl in der G1- als auch in der G2-Phase einen kleinen und ähnlichen Reparaturdefekt auf. Der Reparaturdefekt von ATM- und Artemis-defizienten MEFs bestätigt denjenigen, der in menschlichen Zellen beobachtet wurde (Abb. 4.7. und 4.8.). Der ähnliche Reparaturdefekt der 53BP1-, MDC-1-, Artemis- und ATM-Mutanten führt zur Vermutung, dass MDC-1 und 53BP1, genauso wie Artemis (Abb. 4.8., Beucher et al., 2009), am ATM-Reparaturweg in der G1- und der G2-Phase beteiligt sind. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde das Reparaturverhalten von 53BP1- und MDC-1-Mutanten analysiert, in denen ATM zusätzlich inhibiert wurde.

4.3.4. DSB-Reparatur von 53BP1- und MDC-1-defizienten Zelllinien nach Behandlung mit einem spezifischen ATM-Inhibitor

Der vergleichbare Reparaturdefekt von MDC-1- und 53BP1-Mutanten gegenüber ATM-defizienten MEFs gab einen Hinweis darauf, dass beide Proteine am ATM-Reparaturweg beteiligt sein könnten. Um dies zu überprüfen, wurde in diesen Mutanten mit Hilfe eines spezifischen ATM-Inhibitors (ATMi) ATM inhibiert und anschließend eine DSB-Reparaturanalyse durchgeführt.

4. Ergebnisse

Dafür wurden exponentiell auf Deckgläschen wachsende MEFs 1 h vor der Bestrahlung mit dem ATM-Inhibitor versetzt und bei 37° C inkubiert. Nach Ablauf der Reparaturzeit wurden die Zellen fixiert und angefärbt. Die Antikörperfärbung und die Auswertung der γ H2AX-Foci erfolgten analog zu den vorherigen MEF-Experimenten (Kap. 4.3.3.).

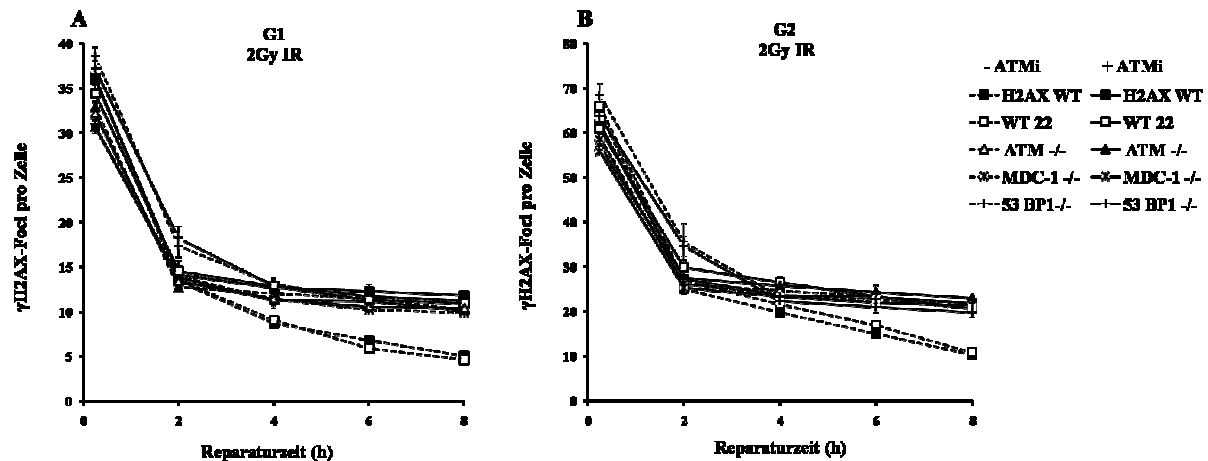


Abb. 4.10. DSB-Reparatur bei MEFs nach Behandlung mit dem ATM-Inhibitor in G1 (A) und G2 (B). Exponentiell wachsende MEFs wurden 1 h mit dem ATM-Inhibitor behandelt, danach mit 2 Gy IR bestrahlt und bei 37° C zur Reparatur weiter inkubiert. Nach 15 min, 2 h, 4 h, 6 h und 8 h wurden die Zellen fixiert und mit spezifischen γ H2AX- und phosphoH3-Antikörpern angefärbt. Die in unbestrahlten Zellen ermittelten Kontrollwerte (0,2-1 Foci in G1, 6-10 Foci in G2) wurden von den dargestellten Werten abgezogen. Die mit DAPI gegengefärbten Zellkerne wurden im Fluoreszenzmikroskop in der G1- und G2-Phase ausgewertet. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler von mindestens drei Experimenten. Die gestrichelten Kurven wurden schon in der Abb. 4.9. dargestellt. Der ATM-Inhibitor wird in der Abbildung als ATMi gekennzeichnet.

In der G1-Phase (Abb.4.10.A) bleiben bei WT-MEFs nach ATM-Inhibition 11 DSBs gegenüber 5 DSBs in unbehandelten Zellen unrepariert. Dies korreliert mit der Anzahl an verbliebenen DSBs, die bei ATM-defizienten MEFs (10,2 DSBs) beobachtet wird, und beweist, dass der ATM-Inhibitor funktionstüchtig ist. Bei Behandlung von ATM-defizienten MEFs mit dem ATM-Inhibitor konnte keine Veränderung im Reparaturverlauf und im Ausmaß des Reparaturdefekts beobachtet werden. 8 h nach Bestrahlung verbleiben 10,2 DSBs bei unbehandelten bzw. 10,4 DSBs bei ATMi-behandelten ATM-defizienten MEFs. Der Inhibitor inhibiert spezifisch ATM und kein anderes strukturähnliches Protein. Der Reparaturverlauf von MDC-1- und 53BP1-Mutanten bleibt trotz der zusätzlichen Inhibition von ATM beinahe unverändert. Es verbleiben durchschnittlich 10 DSBs sowohl bei der ATMi-behandelten als auch bei der unbehandelten MDC-1-Mutante. In der ATMi-behandelten und unbehandelten 53BP1-Mutante sind es durchschnittlich 11,2 DSBs. Somit wird das DSB-Reparaturverhalten von MDC-1- und 53BP1-Mutanten in der G1-Phase durch die zusätzliche Inhibition von ATM nicht beeinflusst. Der 53BP1- und MDC-1-

4. Ergebnisse

Reparaturdefekt addiert sich in der ATMi-behandelten 53BP1- und MDC-1-Mutanten nicht mit dem ATM-Reparaturdefekt. Dies zeigt, dass ATM, MDC-1 und 53BP1 in der G1-Phase an einem gemeinsamen Reparaturweg beteiligt sind.

Auch in der G2-Phase (Abb. 4.10.B) wird durch den Einsatz des ATM-Inhibitors in WT-Zellen der ATM-Reparaturdefekt stimuliert. 21 DSBs verbleiben durchschnittlich in ATMi-behandelten WT-MEFs gegenüber 10 DSBs in unbehandelten Zellen. Die verbliebene Anzahl an DSBs in ATMi-behandelten WT-MEFs korreliert mit derjenigen in ATM-defizienten MEFs (21,7 DSBs), somit ist der ATM-Inhibitor auch in der G2-Phase funktionstüchtig. Der Reparaturverlauf der ATM-Mutante bleibt beinahe unverändert. So bleiben in ATMi-behandelten und unbehandelten ATM-defizienten Zellen durchschnittlich 23 bzw. 22 DSBs unrepariert. Bei der MDC-1-Mutante verbleiben mit und ohne Behandlung mit ATMi 21 DSBs. Die ATMi-behandelten 53BP1-defizienten Zellen lassen 19,7 DSBs unrepariert, während unbehandelte Zellen 20,7 DSBs aufweisen. Die DSB-Reparatur von MDC-1- und 53BP1-Mutanten wird durch die ATM-Inhibition nicht verändert. Auch in der G2-Phase addiert sich der MDC-1- und 53BP1-Reparaturdefekt in der ATMi-behandelten 53BP1- und MDC-1-Mutanten nicht mit dem ATM-Reparaturdefekt, der durch ATMi verursacht wird. Dies weist darauf hin, dass beide Proteine auch in der G2-Phase mit ATM zu einem gemeinsamen Reparaturweg gehören.

MDC-1- und 53BP1-defiziente Zellen zeigen in der G1- und G2-Phase einen ähnlichen Reparaturdefekt wie ATM-defiziente Zellen. Mit ATM-Inhibitor durchgeführte Studien deuten darauf hin, dass MDC-1 und 53BP1 sowohl in der G1- als auch G2-Phase am ATM-Reparaturweg beteiligt sind.

ATM-defiziente Zellen zeigen in der G1- und G2-Phase einen ähnlichen Reparaturdefekt (Abb. 4.7., 4.8., 4.9.). In G0/G1 konnte die ATM-abhängige Reparatur dem NHEJ zugeordnet werden (Riballo et al., 2004). Allerdings steht in der G2-Phase neben dem NHEJ auch die HR als alternativer Reparaturweg zur Verfügung. Daher kann der in der G2-Phase beobachtete Reparaturdefekt sowohl auf einen NHEJ- als auch einen HR-Reparaturdefekt zurückgeführt werden. Um die Zuordnung von ATM in der G2-Phase näher zu untersuchen, sollte das DSB-Reparaturverhalten von ATM- und HR-Mutanten miteinander verglichen werden.

4.3.5. Zuordnung von ATM in der G2-Phase

In diesem Teil der Arbeit sollte untersucht werden, ob ATM in der G2-Phase ebenso wie in der G0/G1-Phase zum NHEJ gehört oder ob es der HR zugeordnet werden kann. Defizienzen

4. Ergebnisse

in ATM führen in allen untersuchten Zellsystemen zu einem Reparaturdefekt in der G2-Phase. Allerdings wurde bisher nicht untersucht, ob dies auf der Beteiligung von ATM am NHEJ beruht, wie es in der G0/G1Phase der Fall ist, oder ob ATM in der G2-Phase an der HR beteiligt ist. Um sich dieser Fragestellung anzunähern, wurde die DSB-Reparatur ebenfalls in HR-defizienten (XRCC2- und Rad54-defizienten) Zellen untersucht. Dabei soll beobachtet werden, ob HR- und ATM-Mutanten Ähnlichkeiten in ihrem Reparaturverhalten aufweisen.

4.3.5.1. Vergleich der DSB-Reparatur von ATM- und HR-defizienten Zellen

Um eine mögliche Beteiligung von ATM an der HR zu analysieren, wurde die DSB-Reparatur von HR-Mutanten durchgeführt und mit der der ATM-Mutante verglichen. Rad54 und XRCC2 sind neben Rad51 an der HR beteiligt (Essers et al., 1999; Mazin et al., 2003; Johnson et al., 1999). Rad54 interagiert mit Rad51 und stimuliert bzw. unterstützt die Bildung des Rad51-Nukleoproteinfilaments und die Suche nach Homologien auf dem intakten DNA-Strang (Clever et al., 1997; Mazin et al., 2003). XRCC2 ist ein Rad51-Paralog, die genaue Funktion in der HR ist noch nicht vollständig geklärt. Bekannt ist, dass XRCC2 mit drei weiteren Rad51-Paralogen Rad51B-D den BCDX2-Komplex bildet, der an ssDNA bindet und die Bildung des Rad51-Nukleoproteinfilaments erleichtert (Davies et al., 2001).

Zur Versuchsdurchführung wurden exponentiell auf Deckgläschen wachsende MEFs 1 h vor Bestrahlung mit ATMi behandelt und bis zur Fixierung bei 37° C inkubiert. Die Färbung der Zellen und die Probenauswertung erfolgten analog zu den vorher beschriebenen MEF-Experimenten (Kap. 4.3.3.)

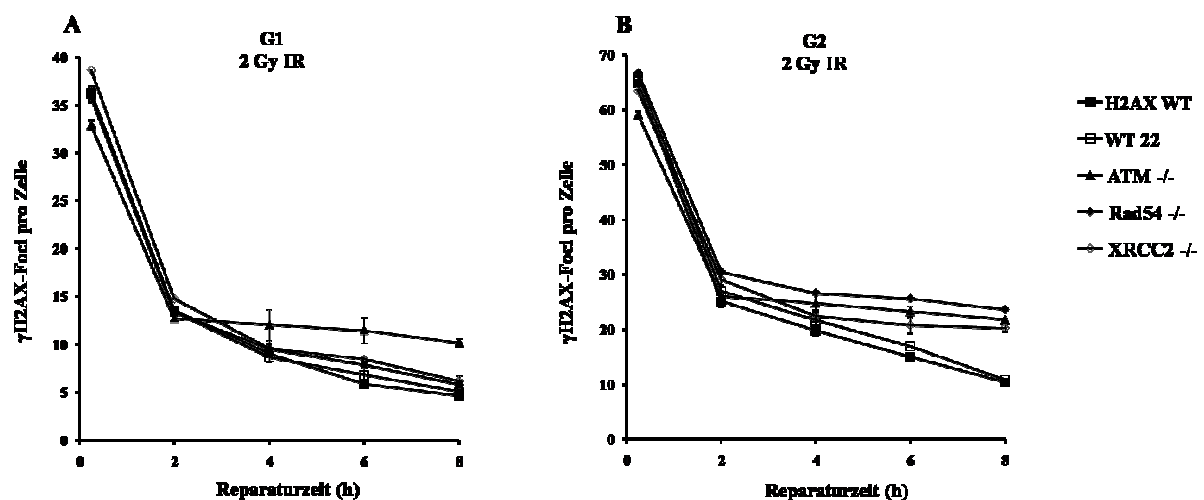


Abb. 4.11. Vergleich des DSB-Reparaturverhaltens von ATM- und HR-defizienten MEFs in G1 (A) und G2 (B). Exponentiell wachsende MEFs wurden mit 2 Gy IR bestrahlt und für 15 min, 2 h, 4 h, 6 h und 8 h bei 37° C zur Reparatur inkubiert. Danach wurden die Zellen fixiert und mit γ H2AX- und phosphoH3-spezifischen

4. Ergebnisse

Antikörpern angefärbt. Die Auswertung der Zellen erfolgte in der G1 (A)- und G2 (B)-Phase. Die in unbestrahlten Proben ermittelten Kontrollwerte (0,2-1 Foci in G1, 6-10 Foci in G2) wurden von den dargestellten Werten abgezogen. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler von mindestens vier Experimenten. Die Reparaturkurven beider WT-Zelllinien H2AX WT und WT22 und der ATM-Mutante wurden bereits in der Abb. 4.9. dargestellt.

In der G1-Phase (Abb. 4.11.A) haben beide WT-Zelllinien ein sehr ähnliches Reparaturverhalten und zeigen eine Reparaturreffizienz von 86 % (Kapitel 4.3.3.). Die ATM-Mutante weist eine Reparaturreffizienz von 72 % in der G1-Phase auf (Kapitel 4.3.3.). Bei XRCC2- und Rad54-Mutanten werden in der G1-Phase durch Bestrahlung 36 DSBs induziert, und davon verbleiben durchschnittlich 6 DSBs, somit werden 83 % der DSBs beseitigt. Die Reparaturreffizienz von HR-defizienten MEFs in der G1-Phase unterscheidet sich kaum von derjenigen der WT-Zelllinien. Dies zeigt, dass HR-Mutanten keinen Reparaturdefekt in der G1-Phase aufweisen. Dies ist auch erwartungsgemäß, da die HR in der G1-Phase unterdrückt wird. Das unterschiedliche Reparaturverhalten von ATM- und HR-Mutanten lässt vermuten, dass ATM und HR-Proteine in der G1-Phase an unterschiedlichen Reparaturwegen beteiligt sind.

In der G2-Phase (Abb. 4.11.B) werden 84 % bzw. 66,6 % der DSBs in WT-Zellen bzw. in der ATM-Mutante beseitigt (Kapitel 4.3.3.). In der XRCC2-Mutante werden durch Bestrahlung 63 DSBs induziert und 8 h danach sind noch 20 DSBs vorhanden, somit werden 68 % der DSBs repariert. Die Rad54-Mutante beseitigt 65 % ihrer strahleninduzierten DSBs, von anfangs 66 DSBs verbleiben noch 23 DSBs. HR-Mutanten lassen 16-19 % mehr DSBs als WT-Zellen unrepariert. Es gibt somit einen eindeutigen Reparaturdefekt von HR-Mutanten in der G2-Phase. Erstaunlicherweise weisen ATM- und HR-Mutanten einen ähnlichen Reparaturdefekt in der G2-Phase auf. Dies führt zur Vermutung, dass ATM an einem gemeinsamen Reparaturweg mit HR-Proteinen (XRCC2, Rad54) beteiligt sein könnte. Um diese Hypothese zu untersuchen wurden bei HR-Mutanten Epistasisanalysen mit dem ATM-Inhibitor durchgeführt.

4.3.5.2. Epistasisanalysen mit dem ATM-Inhibitor bei HR-Mutanten

Es konnte beobachtet werden, dass ATM- und HR-defiziente Zellen in der G2-Phase große Ähnlichkeiten in der DSB-Reparatur aufwiesen. Dies führte zur Vermutung, dass ATM und die HR-Proteine XRCC2 und Rad54 in dieser Zellzyklusphase am gleichen Reparaturweg beteiligt sein könnten. Um dies zu überprüfen, wurde ATM durch Behandlung mit einem ATM-Inhibitor (ATMi) in Rad54- und XRCC2-defizienten Zellen inhibiert. Falls ATM und XRCC2 bzw. Rad54 dem gleichen Reparaturweg zuzuordnen sind, sollte die ATM-Inhibition das Reparaturverhalten der HR-Mutanten in der G2-Phase nicht beeinflussen.

4. Ergebnisse

Zur Versuchsdurchführung wurden exponentiell auf Deckgläschen wachsende MEFs 1 h vor Bestrahlung mit ATMi behandelt und bis zur Fixierung bei 37° C zur Reparatur inkubiert. Die Färbung der Zellen mit Antikörpern und die Probenauswertung erfolgten analog zu den vorherigen MEF-Experimenten (Kapitel 4.3.3.).

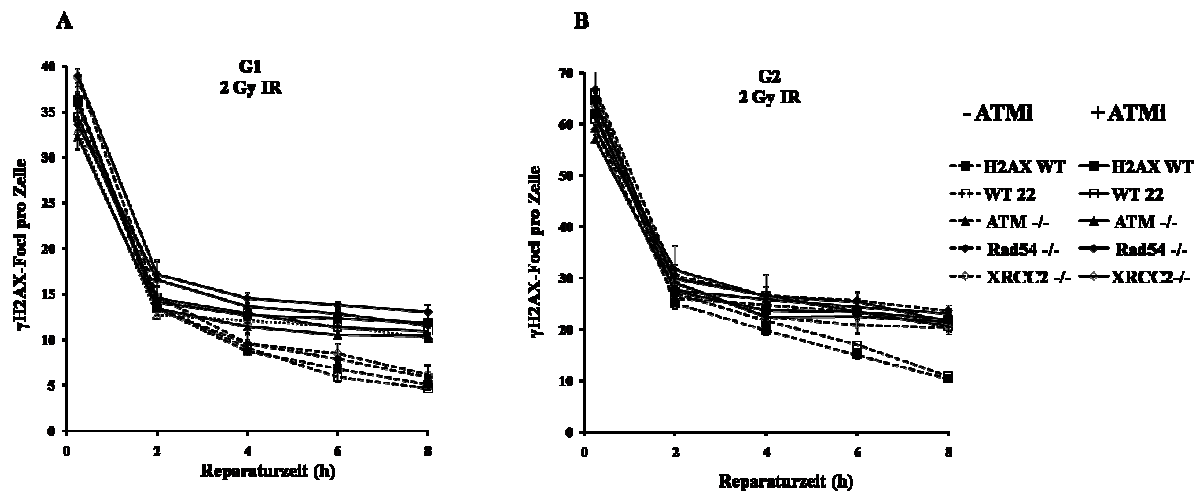


Abb. 4.12. DSB-Reparaturverhalten von HR-defizienten MEFs nach Bestrahlung mit 2Gy und Behandlung mit dem ATM-Inhibitor in der G1 (A)- und G2 (B)-Phase. Die Zellen wurden 1 h vor der Bestrahlung mit 2 Gy IR mit bzw. ohne den ATM-Inhibitor (ATMi) behandelt und danach für 15 min, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h bis zur Fixierung bei 37° C inkubiert. Nach der Fixierung wurden die Zellen mit spezifischen γ H2AX- bzw. phosphoH3-Antikörpern angefärbt. Die in unbestrahlten Proben ermittelten Kontrollwerte (0,2-0,5 Foci in G1, 6-10 Foci in G2) wurden von den dargestellten Werten abgezogen. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler von mindestens drei Experimenten dar. Die in der Abbildung gestrichelten Kurven repräsentieren die unbehandelten Zelllinien und wurden bereits in der Abb. 4.11. dargestellt. Die nicht gestrichelten Kurven stellen die DSB-Reparatur von ATMi-behandelten Zelllinien dar.

Die Funktionalität des ATM-Inhibitors wurde bereits im Kapitel 4.3.4. am Beispiel von WT- und ATM-defizienten Zellen beschrieben.

Die Reparaturreffizienz der WT-Zellen wird in der G1-Phase (Abb. 4.12.A) durch Behandlung mit ATMi vermindert, der ATM-Reparaturdefekt wird simuliert. Es verbleiben 11 DSBs gegenüber 5 DSBs bei unbehandelten Zellen. In der G1-Phase wird auch die DSB-Reparatur von Rad54- und XRCC2-defizienten Zellen durch Behandlung mit ATMi verschlechtert. Statt 5,8 DSBs verbleiben in Rad54-defizienten Zellen nach ATMi-Behandlung 11,5 DSBs. In XRCC2-defizienten Zellen bleiben nach Behandlung mit ATMi 13 DSBs gegenüber 6 DSBs in unbehandelten Zellen erhalten. Die Verschlechterung der DSB-Reparatur und der so entstandene Reparaturdefekt der XRCC2- und Rad54-Mutanten in der G1-Phase nach der Inhibition von ATM sind erwartungsgemäß, da das NHEJ in denen dadurch inhibiert wird.

4. Ergebnisse

WT-Zellen lassen in der G2-Phase (Abb. 4.12.B) 21 DSBs nach ATMi-Behandlung statt 10 DSBs in unbehandelten Zellen unrepariert, auch hier wird der ATM-Reparaturdefekt simuliert. Das Reparaturverhalten der HR-defizienten Zelllinien bleibt durch die Inhibition von ATM unbeeinflusst. In ATMi-behandelten Rad54-defizienten Zellen verbleiben 21,5 DSBs gegenüber 23,6 DSBs in unbehandelten Zellen. ATMi-behandelte XRCC2-defiziente Zellen lassen 21,4 DSBs statt 20,2 DSBs in unbehandelten Zellen unrepariert. Durch die zusätzliche Inhibition von ATM wird der schon vorhandene HR-Reparaturdefekt in HR-Mutanten nicht vergrößert. Dies zeigt, dass ATM und klassische HR-Proteine in der G2-Phase am gleichen Reparaturweg und nicht an unterschiedlichen Reparaturwegen wie in der G1-Phase beteiligt sind. Diese Beobachtung deutet verstärkt darauf hin, dass ATM in der G2-Phase eine HR-Komponente ist.

ATM-, Artemis-, MDC-1- und 53BP1-Mutanten weisen einen kleinen und identischen Reparaturdefekt sowohl in der G1- als auch G2-Phase auf. Zudem sind Artemis, MDC-1 und 53BP1 am ATM-abhängigen Reparaturweg beteiligt. Die Inhibition von ATM in der HR-Mutanten deutet darauf hin, dass ATM ein HR-Protein in der G2-Phase ist. Somit übernimmt ATM eine duale Funktion in der G1-Phase beim NHEJ und in der G2-Phase bei der HR. Der kleine Reparaturdefekt der HR-Mutanten in der G2-Phase lässt vermuten, dass HR in der G2-Phase einen kleinen Reparaturanteil gegenüber NHEJ übernimmt. Um dies zu verifizieren, sollte die DSB-Reparatur von NHEJ-Mutanten in der G1- und insbesondere in der G2-Phase analysiert werden.

4.4. Der Anteil von NHEJ und HR zur Reparatur von strahleninduzierten DSBs.

Die HR-Mutanten weisen eine DSB-Reparatureffizienz von 65-68 % in der G2-Phase (Kap. 4.3.5.1.). Damit reparieren sie mehr als die Hälfte der strahleninduzierten DSBs. Dies deutet darauf hin, dass die HR einen kleinen Anteil an der DSB-Reparatur neben dem NHEJ in der G2-Phase übernimmt. Umgekehrt hieße dies, dass das NHEJ den größten Teil der DSB-Reparatur in der G2-Phase übernehme. Um dies zu verifizieren, wurde die DSB-Reparatur von NHEJ-Mutanten in der G1- und G2-Phase durchgeführt.

Die Zelle verfügt über zwei Hauptreparaturmechanismen zur Entfernung von DNA-DSBs, das NHEJ und die HR (van Gent et al., 2001; Li und Heyer, 2008; Sonoda et al., 2006; O'Driscoll und Jeggo, 2006). Das NHEJ ist in allen Zellzyklusphasen aktiv, in der G1-Phase stellt dies den Hauptreparaturweg dar. Allerdings ist dies kein fehlerfreier

4. Ergebnisse

Reparaturmechanismus, da es zu Deletionen oder Insertionen kommen kann (Lieber, 2008). Dabei werden zwei DNA-Bruchenden zufällig miteinander verbunden, ohne dass homologe DNA-Sequenzen benötigt werden. Zu den klassischen NHEJ-Faktoren gehören der DNA-PK- und der Ligase4/XRCC4/XLF-Komplex. Defizienzen in einem dieser Faktoren führen zu einer stark verminderten DSB-Reparatur und einer starken Strahlensensitivität. Die HR läuft im Gegensatz zum NHEJ meist fehlerfrei und benötigt für die Reparatur der geschädigten DNA zum Bruchbereich homologe DNA-Sequenzen. Diese werden bevorzugt von der Schwesterchromatide zur Verfügung gestellt (Thomas und Schild, 2001). Deswegen ist die HR nur in der S- und G2-Phase aktiv. Zu den HR-Faktoren gehören unter anderem Rad51, Rad54, RPA, BRCA1, BRCA2 (Li und Heyer, 2008) und XRCC2. Defizienzen in einem dieser Faktoren können unterschiedliche Auswirkungen haben: Während die Mutation von Rad51 letal ist (Sonoda et al., 1998), führt die Inaktivierung von Rad54 zu einer leichten Zunahme der Strahlensensitivität (Essers et al., 2000). Eine Defizienz in XRCC2 führt zu einer deutlichen Zunahme der Strahlenempfindlichkeit (Takata et al., 2001). Obwohl NHEJ und HR Gegenstand intensiver Forschung von mehreren Arbeitsgruppen sind, wurden der Verlauf der Reparaturkinetik und die Effizienz der Reparatur beider Mechanismen bisher nicht direkt miteinander verglichen.

Im Folgenden wurde zuerst die DSB-Reparatur von NHEJ-defizienten primären menschlichen Zelllinien untersucht.

4.4.1. DSB-Reparatur von XLF- und Ligase4-defizienten primären menschlichen Fibroblasten

XLF und Ligase4 sind Bestandteile des XRCC4/Ligase4/XLF-Proteinkomplex, der für die Ligation der Doppelstrangbruchenden zuständig ist. XLF und Ligase4 interagieren miteinander, und XLF soll die Aktivität von Ligase4 verstärken (Ahnesorg et al., 2006; Callebaut et al., 2006).

Untersucht wurde die DSB-Reparatur von MRC-5-, HSF-1-, 180Br- und 2BN-Zellen. MRC-5 und HSF-1 sind reparaturprofiziente WT-Zelllinien. 180Br ist eine Zelllinie, bei der die Expression von Ligase4 stark vermindert ist. Bei der 2BN-Zelllinie wird kein XLF/Cernunnos exprimiert. Die Versuchsdurchführung und die Probenauswertung erfolgten analog zu den vorher beschriebenen Experimenten (Kap. 4.2.2.).

4. Ergebnisse

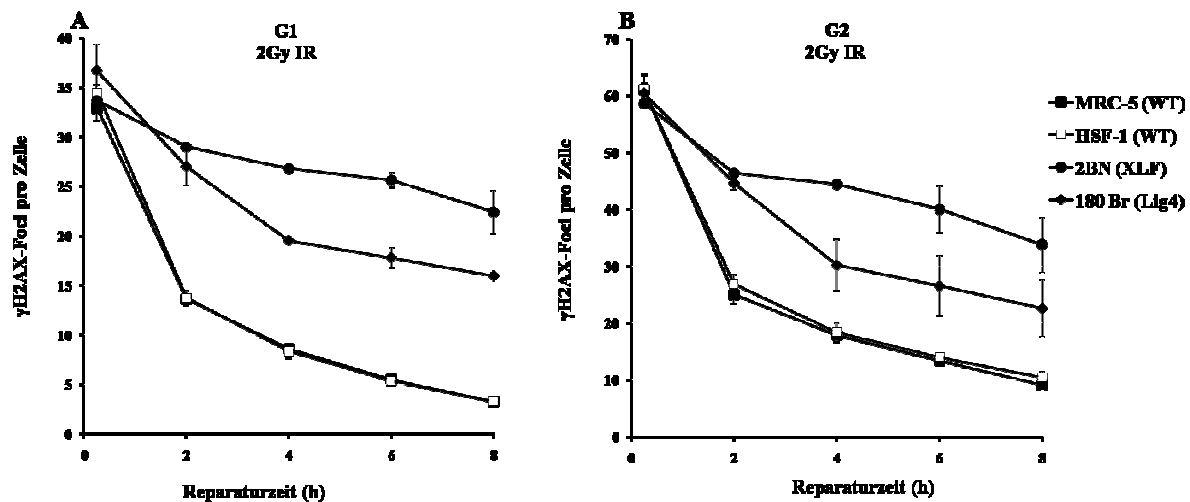


Abb. 4.13. DSB-Reparaturverhalten von NHEJ-defizienten primären menschlichen Fibroblasten in G1 (A) und G2 (B). Aufgetragen ist die mittlere Anzahl an γ H2AX-Foci pro Zelle in Abhängigkeit von der jeweiligen Reparaturzeit. Exponentiell auf Deckgläschen wachsenden Zellen wurden mit 2 Gy IR bestrahlt, mit Aphidicolin versetzt und für 15 min, 2 h, 4 h, 6 h und 8 h bei 37° C zur Reparatur inkubiert. Danach wurden die Zellen fixiert und mit γ H2AX- und CENP-F- spezifischen Antikörpern angefärbt. Die Zellkerne wurden mit DAPI gegengefärbt. G1- und G2-Zellen wurden anhand des CENP-F-Färbungsmusters identifiziert, die Anzahl der γ H2AX-Foci wurde quantifiziert. Die in unbestrahlten Proben ermittelten Kontrollwerte (0,08-0,2 Foci in G1, 2,9-6 Foci in G2) wurden von den dargestellten Fociwerten abgezogen. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler aus mindestens drei Experimenten dar. Die Reparaturkurven der MRC-5- und HSF-1-Zellen (WT) wurden bereits in der Abb. 4.7. dargestellt.

WT-Zellen weisen eine Reparaturreffizienz von 90 % in der G1-Phase auf (Kap. 4.3.1.). In der Ligase4-defizienten Zelllinie (180Br) werden in der G1-Phase (Abb. 4.13.A) 36 DSBs induziert, von denen 8 h nach Bestrahlung 16 DSBs unrepariert verbleiben, was einer Reparaturreffizienz von 55 % entspricht. Bei der XLF-defizienten Zelllinie (2BN) verbleiben 22,5 von 34 strahleninduzierten DSBs in der G1-Phase. Es konnten lediglich 34 % der induzierten DSBs repariert werden. Somit zeigen NHEJ-Mutanten in der G1-Phase einen sehr starken Reparaturdefekt im Vergleich zu WT-Zelllinien. Allerdings ist der Reparaturdefekt der XLF-defizienten Zelllinie deutlich stärker als derjenige, der in der Ligase4-defizienten Zelllinie zu beobachten ist. Dies liegt höchstwahrscheinlich daran, dass die 180Br-Zelllinie eine hypomorphe Mutation trägt, die eine Restaktivität von Ligase4 erlaubt. Diese Ergebnisse bestätigen die in der Literatur beschriebene Aufgabe des NHEJ als Hauptreparaturweg in der G1-Phase des Zellzyklus (Helleday et al., 2007; Shrivastav et al., 2008).

In der G2-Phase werden 84 % der DSBs durch WT-Zellen beseitigt (Kap.4.3.3.1.). In 180Br-Zellen werden durch die Bestrahlung 60 DSBs verursacht, davon werden innerhalb von 8 h etwa 63 % entfernt, sodass 22 DSBs unrepariert bleiben. Bei der 2BN-Zelllinie bleiben von 59 induzierten DSBs 8 h nach Bestrahlung 34 DSBs erhalten, es werden 42 % der strahleninduzierten DSBs beseitigt (Abb. 4.13.B). Somit zeigen NHEJ-defiziente Zelllinien auch in der G2-Phase einen starken Reparaturdefekt. Dies ist wie in der G1-Phase (Abb.

4. Ergebnisse

4.13.A) in der XLF-defizienten Zelllinie deutlich stärker als in der hypomorphen Ligase4-defizienten 180Br-Zelllinie ausgeprägt. Dieser große Reparaturdefekt verdeutlicht die große Bedeutung des NHEJ auch in der G2-Phase des Zellzyklus und ist im Einklang mit dem beobachteten kleinen Reparaturdefekt der HR-Mutanten in der G2-Phase (Abb. 4.11.). Der Vergleich der prozentualen Reparatur von NHEJ-Mutanten in der G1- und G2-Phase zeigt, dass die Effizienz der DSB-Reparatur in der G2-Phase um mindestens 8 % größer als in der G1-Phase ist. Diese Tatsache kann dadurch erklärt werden, dass in der G2-Phase neben dem NHEJ auch die HR zur Verfügung steht und ein Teil der DSBs über diesen Weg repariert wird.

Zur Bestätigung dieser Ergebnisse werden analoge Experimente mit 82-6 hTert (WT) und 2BN hTert (XLF-defizient) durchgeführt. Bei diesen Zelllinien handelt es sich um primäre menschlichen Fibroblasten, die durch stabile Transfektion mit der katalytischen Untereinheit des Telomerase-Gens immortalisiert wurden und somit im Gegensatz zu den vorher verwendeten Zelllinien keine Seneszenz zeigen (Abb. 4.14.).

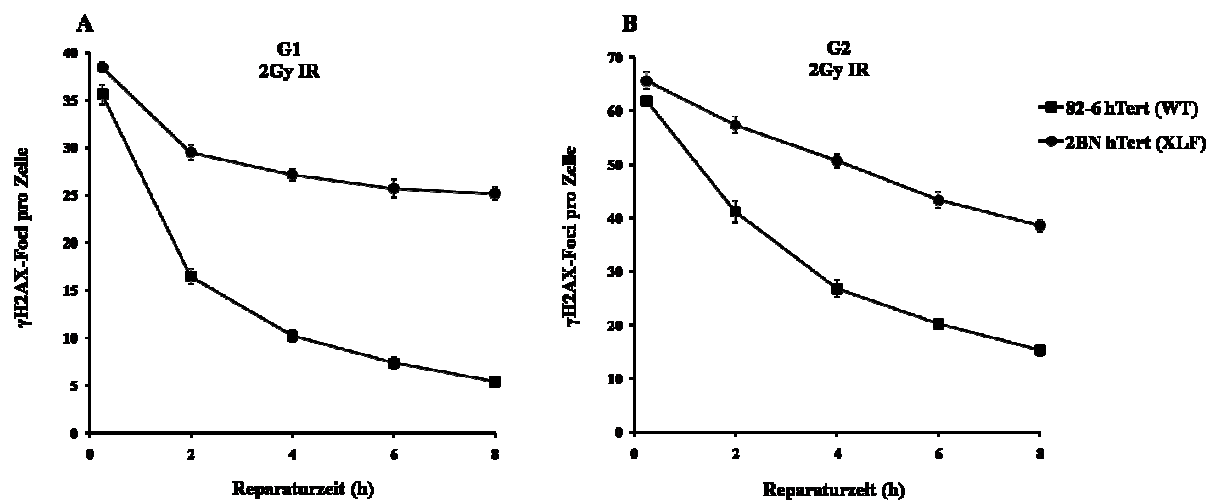


Abb 4.14. DSB-Reparaturverhalten von immortalisierten menschlichen Fibroblasten in der G1 (A)- bzw. G2 (B)-Phase. Exponentiell auf Deckgläschen wachsende Zellen wurden mit 2 Gy IR bestrahlt, mit Aphidicolin versetzt und bei 37° C zur Reparatur inkubiert. 15 min, 2 h, 4 h, 6 h und 8 h nach Bestrahlung wurden die Zellen fixiert und mit γ H2AX- und CENP-F-spezifischen Antikörpern angefärbt. Die Auswertung der γ H2AX-Foci erfolgte unter dem Fluoreszenzmikroskop bei 1000facher Vergrößerung. Bei den dargestellten Fociwerten wurden die in unbestrahlten Zellen ermittelten Kontrollwerte (0,2-0,5 Foci in G1, 4-5 Foci in G2) bereits abgezogen. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler aus drei unabhängigen Experimenten dar.

In der G1-Phase (Abb. 4.14.A) werden in 82-6 hTert-Zellen (WT) durch die Bestrahlung 35 DSBs induziert, und 8 h danach verbleiben noch 5 DSBs, somit werden 85 % der DSBs beseitigt. Bei der XLF-defizienten Zelllinie dagegen sind von 38 strahleninduzierten DSBs

4. Ergebnisse

noch 25 vorhanden, was einer Reparaturreffizienz von 34 % entspricht. Somit zeigt die 2BN hTert-Zelllinie verglichen mit der WT-Zelllinie einen sehr starken Reparaturdefekt.

In der G2-Phase (Abb. 4.14.B) werden in WT-Zellen durch die Bestrahlung 62 DSBs induziert, innerhalb von 8 h verbleiben 15 DSBs, was einer Reparaturreffizienz von 76 % entspricht. Die XLF-defiziente Zelllinie beseitigt 41 % der DSBs, von 65 strahleninduzierten DSBs sind nach 8 h noch 38 DSBs vorhanden. Auch in der G2-Phase zeigt die NHEJ-Mutante einen starken Reparaturdefekt. Die Reparaturreffizienz der XLF-defizienten hTert-Zellen ist in der G2-Phase um 7 % besser als in der G1-Phase, was vermutlich den Anteil der HR an der DSB-Reparatur widerspiegelt.

Die immortalisierten menschlichen Fibroblasten zeigen ebenso wie primäre Zellen (Abb. 4.13.) einen starken Reparaturdefekt in der G1- und G2-Phase. Damit ist die große Bedeutung des NHEJ in der G2-Phase bei den primären menschlichen Fibroblasten bestätigt. Zur Untermauerung dieses Ergebnis wurde die DSB-Reparatur weiterer NHEJ-inhibierten menschlichen Zellen analysiert.

4.4.2. DSB-Reparatur in HeLa-Zellen nach Herunterregulation von Ligase4

Um den bedeutenden Anteil des NHEJ in der G2-Phase weiter zu untersuchen, wurde das NHEJ-Protein Ligase4 in HeLa-Zellen herunterreguliert.

Zur Versuchsdurchführung wurden exponentiell wachsende Zellen mit Ligase4-siRNA transfiziert, auf Deckgläschen ausgesät und bei 37° C inkubiert. Parallel wurden Zellen mit Kontroll-siRNA behandelt, die keine gezielte Geninaktivierung verursachte. Zum Zeitpunkt der maximalen Inaktivierung des Ligase4-Proteins 72 h nach der Transfektion (Olivia Barton, persönliche Mitteilung), wurden die Zellen mit 2 Gy IR bestrahlt, mit Aphidicolin versetzt und bis zur Fixierung bei 37° C inkubiert. Die Färbung von Zellen mit Antikörpern und die Auswertung der Deckgläschen erfolgten analog zu den vorher durchgeführten Experimenten (Kapitel 4.2.2.).

4. Ergebnisse

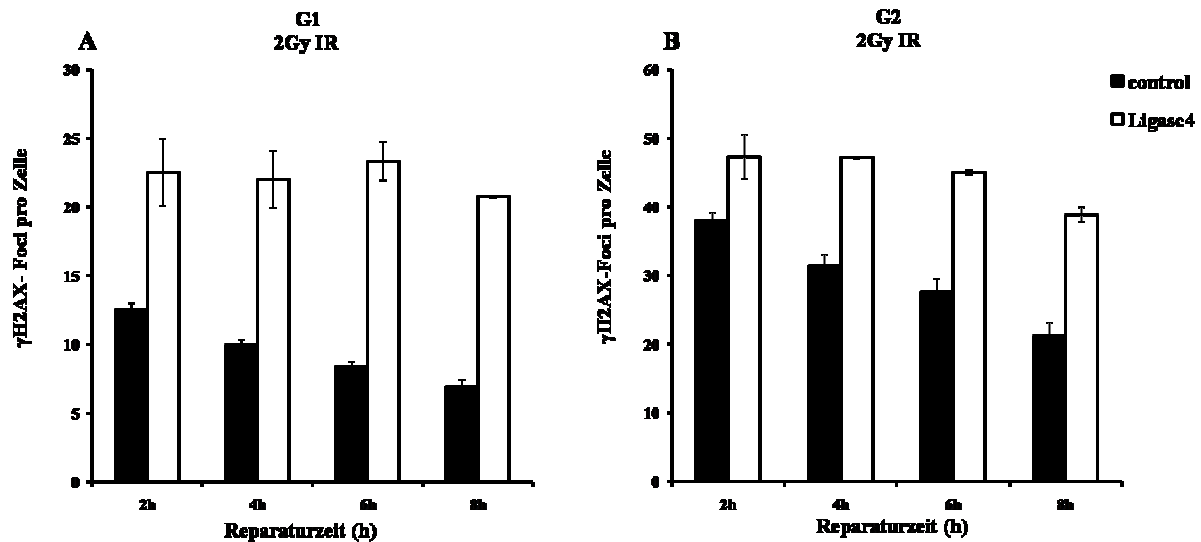


Abb. 4.15. DSB-Reparaturverhalten von HeLa-Zellen nach Transfektion mit Kontroll-siRNA bzw. Ligase4-siRNA. Exponentiell wachsende Zellen wurden mit Kontroll-siRNA bzw. Ligase4-siRNA transfiziert und 72 h nach der Transfektion mit 2 Gy IR bestrahlt. Nach Ablauf der jeweiligen Reparaturzeit (2 h, 4 h, 6 h, 8 h) wurden die Zellen fixiert und mit γ H2AX- und CENP-F-spezifischen Antikörpern angefärbt. Die Quantifizierung der γ H2AX-Foci erfolgte in G1 (A) und G2 (B). Die in unbehandelten Zellen ermittelten Kontrollwerte (0,2-0,5 Foci in G1 bzw. 4-5 Foci in G2) wurden von den gezeigten Fociwerten abgezogen. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler aus mindestens zwei Experimenten dar.

In der G1-Phase zeigt sich bereits 2 h nach Bestrahlung ein deutlicher Effekt der siRNA-Behandlung (4.14.A). In Kontrollzellen sind 12,5 DSBs vorhanden, während Ligase4-depletierte Zellen 22,5 DSBs aufweisen. Diese Anzahl an DSBs bleibt nahezu konstant, nach 8 h sind immer noch 21 DSBs vorhanden. Dagegen reparieren die Kontroll-siRNA-behandelten Zellen bis auf 7 DSBs nach Bestrahlung. Die Herunterregulation von Ligase4 verschlechtert in der G1-Phase die DSB-Reparatur von HeLa-Zellen, denn im Vergleich zum Kontrollansatz bleiben bei Ligase4-depletierten Zellen 14 DSBs mehr erhalten. Diese Abnahme der DSB-Reparaturkapazität in HeLa-Zellen ist in der G1-Phase erwartungsgemäß, da Ligase4 ein wichtiges NHEJ-Reparaturprotein und NHEJ der Hauptreparaturweg in der G1-Phase ist.

In der G2-Phase (Abb. 4.14.B) sind in Kontroll-siRNA-transfizierten Zellen 2 h nach Bestrahlung 38 DSBs vorhanden, 8 h danach sind es noch 21 DSBs. Dagegen verbleiben bei den Ligase4-depletierten Zellen 2 h bzw. 8 h nach Bestrahlung 47 DSBs bzw. 38 DSBs. Auch in der G2-Phase ist eine große Abnahme der DSB-Reparatur in Ligase4-depletierten HeLa-Zellen zu beobachten, da sie im Vergleich zu Kontrollzellen 17 DSBs mehr unrepariert hinterlassen. Dieser große Ligase4-Reparaturdefekt verdeutlicht die dominierende Funktion von NHEJ in der G2-Phase.

4. Ergebnisse

Die Analyse der DSB-Reparatur von menschlichen Zelllinien hat gezeigt, dass NHEJ-Mutanten einen starken Reparaturdefekt in der G1- und G2-Phase haben. Um auszuschließen, dass die beschriebenen Effekte speziesabhängig sind, wurde die DSB-Reparatur von NHEJ-Mutanten auch in murinen Zelllinien durchgeführt.

4.4.3. DSB-Reparatur in Ku80-, DNA-PKcs- und Ligase4-defizienten murinen embryonalen Fibroblasten (MEFs).

Nachdem die große Bedeutung des NHEJ sowohl in der G1- wie auch G2-Phase in humanen Zellen in NHEJ-defizienten primären Fibroblasten und nach siRNA-vermittelter Herunterregulation von NHEJ bestätigt werden konnte, sollte nun die Abhängigkeit dieses Defekts von der Herkunft der Zelllinie überprüft werden. Dazu wurden Versuche mit transformierten embryonalen murinen Fibroblasten (MEFs) durchgeführt. Zusätzlich verfügen MEFs über eine Reihe klassischer NHEJ-Mutanten.

Untersucht wurde das Reparaturverhalten von zwei WT-Zelllinien (H2AX WT und WT22) und von Ligase4-, Ku80- und DNA-PKcs-defizienten Zelllinien (Abb. 4.15.). Ku80 bindet zusammen mit Ku70 an die DSB-Enden, und danach erfolgt die Rekrutierung der DNA-PKcs. Ku70, Ku80 und DNA-PKcs bilden zusammen den DNA-PK-Komplex. Die Versuchsdurchführung und die Probenauswertung erfolgten analog zu den vorherigen Experimenten (Kap. 4.3.3.).

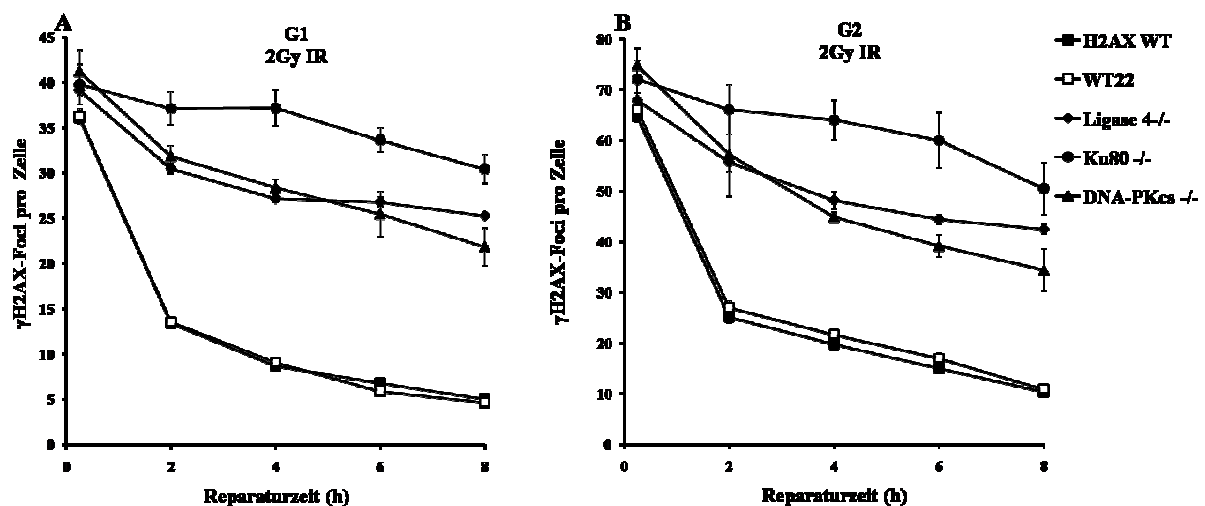


Abb. 4.16. DSB-Reparaturverhalten von NHEJ-defizienten MEFs in der G1 (A)- und G2 (B)-Phase. Exponentiell wachsende MEFs wurden mit 2 Gy IR bestrahlt, mit Aphidicolin versetzt und für 0,25 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h zur Reparatur bei 37° C inkubiert, danach wurden die Zellen fixiert. Nach der Fixierung wurden die Zellen mit γ H2AX- und phosphoH3-spezifischen Antikörpern angefärbt. Die γ H2AX-Analyse erfolgte unter dem Fluoreszenzmikroskop bei 1000facher Vergrößerung. Bei den dargestellten γ H2AX-Fociwerten wurden die in unbestrahlten Zellen ermittelten Kontrollwerte (0,08-1,8 Foci in G1, 8-15 Foci in G2) abgezogen. Die

4. Ergebnisse

Fehlerbalken stellen den Standardfehler aus zwei bis acht Experimenten dar. Die Reparaturkurven beider WT-Zelllinien wurden bereits in der Abb. 4.9 dargestellt.

Die WT-Zellen weisen eine Reparatureffizienz von 86 % in der G1-Phase auf (Kap. 4.3.3.). Die DNA-PKcs-defiziente Zelllinie beseitigt 48 % ihrer DSBs, von den 41 strahleninduzierten-DSBs verbleiben 21 DSBs. In den Ligase4- bzw. Ku-80-defizienten MEFs werden jeweils 39 DSBs durch Bestrahlung induziert, von denen nach 8 h 25 bzw. 30 DSBs erhalten bleiben. Dies entspricht einer Reparatureffizienz von 36 % bzw. 23 %. Somit zeigen alle untersuchten NHEJ-defizienten MEFs in der G1-Phase (Abb. 4.15.A) einen starken Reparaturdefekt gegenüber WT-MEFs, denn mehr als 50 % der DSBs bleiben unrepariert.

84 % der DSBs werden in WT-Zellen in der G2-Phase beseitigt (Kap. 4.3.3.). Dagegen repariert die DNA-PKcs-Mutante nur 54 % ihrer DSBs, 34 der anfänglichen 74 DSBs bleiben erhalten (Abb. 4.15.B). Die Ligase4-defizienten MEFs reparieren mit einer Reparatureffizienz von 38 % noch schlechter als die DNA-PKcs-defizienten MEFs, 42 der 68 strahleninduzierte DSB bleiben erhalten. Ku80-defiziente MEFs zeigen mit 30 % die schlechteste Reparatureffizienz. Von 72 induzierten DSBs sind nach 8 h noch 50 DSBs vorhanden. Die untersuchten NHEJ-defizienten MEF-Zelllinien zeigen auch in der G2-Phase einen starken Reparaturdefekt (Abb.4.15.B). Es werden wie in der G1-Phase mit Ausnahme der DNA-PKcs-Mutante mehr als 50 % der strahleninduzierten DSBs nicht repariert.

Alle untersuchten NHEJ-Mutanten zeigen sowohl bei menschlichen als auch bei murinen Zelllinien einen sehr starken Reparaturdefekt in der G1-Phase. Dieser Befund ist mit der Literatur vereinbar, die beschreibt, dass DSBs in der G1-Phase hauptsächlich durch NHEJ beseitigt werden (Helleday et al., 2007; Shrivastav et al., 2008). Ob dies der einzige in der G1-Phase verfügbare Reparaturweg ist, bleibt fraglich, da einige DSBs trotz des starken Reparaturdefekts bei NHEJ-mutierten Zelllinien repariert werden. Auch in der G2-Phase zeigen NHEJ-Mutanten einen sehr starken Reparaturdefekt. Tatsächlich bleiben bei fast allen untersuchten NHEJ-Mutanten mehr als 50 % der DSBs in der G2-Phase unrepariert. Diese Befunde zusammen mit der DSB-Reparatureffizienz der HR-Mutanten, die mehr als 50 % der DSBs beseitigen (Kap. 4.3.5.), bestätigen die dominante Funktion des NHEJ gegenüber der HR in der G2-Phase.

4. Ergebnisse

Bei der Betrachtung der DSB-Reparaturkinetik ist auffällig, dass die Reparatur anscheinend mit unterschiedlicher Geschwindigkeit abläuft, und zwar zunächst schnell und dann langsam. Dies soll im nächsten Abschnitt genauer betrachtet werden.

4.4.4. Vergleich der NHEJ- und HR-Reparaturgeschwindigkeiten

Durch die Analyse des DSB-Reparaturverlaufs von WT-Zellen, NHEJ- und HR-Mutanten kann die Kinetik der DSB-Reparatur durch NHEJ und HR dokumentiert werden. WT-Zellen zeigen einen charakteristischen Verlauf der DSB-Reparatur. In der G1-Phase werden innerhalb der ersten 4 h nach Bestrahlung 71–75 % der DSBs repariert (Abb. 4.7.A, 4.9.A und 4.14.A). Ab 4 h bis 8 h werden weitere 12–15 % der DSBs beseitigt. Innerhalb der ersten 4 h nach Bestrahlung werden in WT-Zellen in der G2-Phase 57–70 % der DSBs repariert, ab 4 h bis 8 h werden weitere 13–18 % der DSBs beseitigt (Abb. 4.7.B, 4.9.B und 4.14.B). Sowohl in der G1- als auch der G2-Phase scheint innerhalb der ersten Stunden die Reparatur mit einer schnellen Kinetik abzulaufen, wogegen zu späteren Zeitpunkten eher eine langsame Reparatur erfolgt.

NHEJ-Mutanten weisen in der G1-Phase bereits innerhalb der ersten 4 h einen massiven Reparaturdefekt auf, es sind noch 70–93 % der DSBs vorhanden (Abb. 4.13.A, 4.14.A und 4.16.A). In der G2-Phase sind es 71–89 % der DSBs (Abb. 4.13.B, 4.14.B und 4.16.B). Bei der schnellen Reparaturkomponente handelt es sich demnach um das NHEJ. Ab 4 h bis 8 h bleiben in NHEJ-Mutanten in der G1-Phase noch 65–76 % der DSBs erhalten, sodass nur bis zu 17 % der DSBs beseitigt werden. In der G2-Phase sind es noch 59–76 % der DSBs, somit werden bis zu 13 % der DSBs später beseitigt. Dies deutet darauf hin, dass die Mehrheit der DSBs in der G1- und der G2-Phase mit einer schnellen Kinetik über das NHEJ beseitigt wird. Da NHEJ-Mutanten über eine funktionelle HR in der G2-Phase verfügen, wird bei späteren Zeitpunkten ein minimaler Anteil (13 %) an DSBs über die HR beseitigt.

HR-Mutanten zeigen in der G1-Phase ein ähnliches Reparaturverhalten wie WT-Zellen (Abb. 4.11.A). Dieser Reparaturweg hat in der G1-Phase keine Bedeutung. In der G2-Phase zeigen sie zu kurzen Zeiten einen sehr ähnlichen Reparaturverlauf wie WT-Zellen (Abb. 4.11.B), d.h. dass bis zu 70 % der DSBs bereits beseitigt werden. Dieser Reparaturanteil wird durch NHEJ übernommen, da HR-Mutanten über ein funktionelles NHEJ verfügen. Erst ab 4 h wird bei HR-Mutanten ein Reparaturdefekt sichtbar. 8 h nach Bestrahlung sind 16–19 % mehr DSBs als in WT-Zellen vorhanden. Dies korreliert mit dem Reparaturanteil in WT-Zellen (13–18 %) zu späteren Reparaturzeiten. Die HR stellt somit die langsame Reparaturkomponente dar.

4. Ergebnisse

ATM-, Artemis-, MDC-1- und 53BP1-Mutanten zeigen nahezu in der G1- und der G2-Phase innerhalb der ersten 2 h nach Bestrahlung ein ähnliches Reparaturmuster wie in WT-Zellen (Abb. 4.7. und 4.9.). Erst ab 4 h wird ein zunehmender Reparaturdefekt sichtbar, sodass 14–16 % der DSBs in beiden Zellzyklusphasen unrepariert bleiben (Kap. 4.3.3.). Dieser Anteil an verbliebenen DSBs korreliert in der G1-Phase mit dem Anteil an DSBs, der zu späteren Zeiten in NHEJ-Mutanten noch beseitigt werden. Somit stellen ATM, Artemis, MDC-1 und 53BP1 die langsamen Reparaturkomponenten des NHEJ in der G1-Phase dar. Dennoch gehören diese Proteine nicht zu den klassischen NHEJ-Faktoren, die die schnelle Reparatur in der G1-Phase übernehmen. In der G2-Phase korreliert der Anteil an verbliebenen DSBs in ATM-, Artemis-, 53BP1- und MDC-1-Mutanten mit demjenigen in HR-Mutanten (16-19 %, Kap. 4.3.5.). Somit stellen diese Proteine auch die langsame Reparaturphase über HR dar. Sie gehören auch nicht zu den klassischen HR-Faktoren, da im Gegensatz zu diesen weisen sie einen Reparaturdefekt in der G1-Phase auf.

4.5. DSB-Reparatur von HR/NHEJ-defizienten Zellen

Um das Ausmaß des Reparaturdefekts nach dem Verlust von NHEJ und HR zu analysieren, wurde das Reparaturverhalten von unterschiedlichen Zelllinien mit Defekten in beiden Reparaturwegen untersucht. Zunächst wurde die DSB-Reparatur von Rad51/Ku80-depletierten HeLa-Zellen analysiert.

4.5.1. DSB-Reparatur von Rad51/Ku80-depletierten Zellen

Rad51 spielt die zentrale Rolle in der HR. Nach Auftreten eines DSBs werden die 5'-Enden so prozessiert, dass es 3'-überhängende Enden entstehen. An diesen bindet zuerst RPA, das von Rad51 mit Hilfe von Rad52 und BRCA2 verdrängt wird. Es entsteht ein Rad51-Nukleoproteinfilament, das die unbeschädigte DNA auf der Suche nach homologen Sequenzen zum Bruchbereich invadiert. Ku80 wird dagegen im NHEJ gebraucht, wo es nach Bindung an die Bruchenden die Reparatur initiiert. Dadurch erfolgt die Rekrutierung der DNA-PKcs an den Bruch und später die Ligation der Bruchenden durch den Ligase4/XRCC4/XLF-Komplex.

Zur Versuchsdurchführung wurden exponentiell wachsende HeLa-Zellen mit Rad51 siRNA bzw. Ku80 siRNA und Ku80 und Rad51 siRNA transfiziert. 72 h nach der Transfektion (Zu diesem Zeitpunkt erfolgt die maximale simultane Herunterregulation von Ku80 und Rad51 in der Zelle, Olivia Barton persönliche Mitteilung) wurden die Zellen mit 2 Gy IR bestrahlt. Die weitere Behandlung der Zellen erfolgte analog zu den vorher beschriebenen Experimenten (Abb. 4.3.2.).

4. Ergebnisse

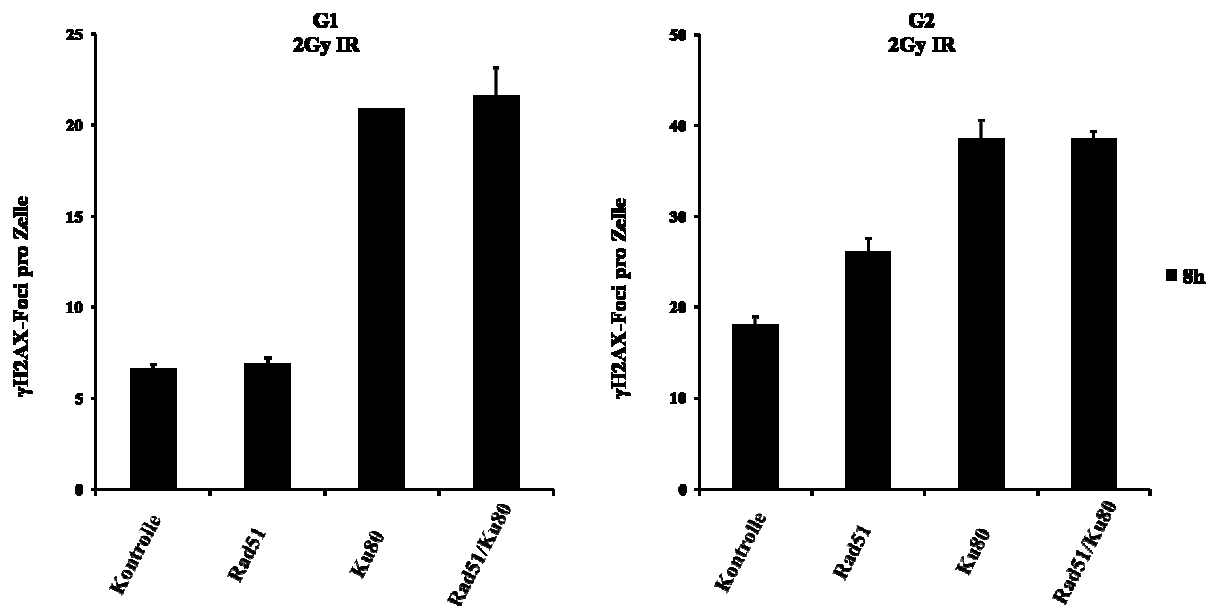


Abb. 4.17. DSB-Reparaturverhalten von Rad51-, Ku80- und Rad51/Ku80-depletierten HeLa-Zellen in der G1 (A)- und G2 (B)-Phase. Exponentiell wachsende Zellen wurden mit Rad51-, Ku80- Rad51/Ku80-siRNA transfiziert. 72 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit 2 Gy IR bestrahlt, mit Aphidicolin versetzt und für 8 h bei 37° C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und mit γ H2AX- und CENP-F-spezifischen Antikörpern angefärbt. Von den dargestellten Werten wurden bereits die in unbestrahlten Proben ermittelten Kontrollwerte (0,1 Foci in G1, 5 Foci in G2) abgezogen. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler aus mindestens vier Experimenten dar.

8 h nach Bestrahlung verbleiben in der G1-Phase (Abb. 4.17.A) 6,6 DSBs in Zellen, die mit Kontroll-siRNA transfiziert wurden. In Rad51-depletierten Zellen sind es 6,8 DSBs. Die Rad51-Depletion verursacht in der G1-Phase keine Erhöhung der DSB-Anzahl, somit hat die Unterdrückung der Expression von Rad51 keinen Einfluss auf die DSB-Reparatur in der G1-Phase. Dies entspricht den Erwartungen, da Rad51 ein HR-Protein ist und die HR in dieser Phase des Zellzyklus nicht aktiv ist. Dagegen verursacht die Ku80-Depletion einen starken Reparaturdefekt in der G1-Phase. Es verbleiben 20,9 DSBs. Der Ku80-Reparaturdefekt ist mit dem von Ligase4-depletierten Zellen 8 h nach Bestrahlung vergleichbar (22,5 DSBs, Abb. 4.15.A). Nach gleichzeitiger Herunterregulation von Rad51 und Ku80 verbleiben 8 h nach Bestrahlung 21,6 DSBs, dies ist mit der Situation einer alleinigen Depletion von Ku80 zu vergleichen. Die Herunterregulation von Rad51 hat somit keine Auswirkung auf die DSB-Reparatur in der G1-Phase. Dies ist erwartungsgemäß, da Rad51 keine Funktion in der G1-Phase übernimmt. In der G2-Phase (Abb. 4.17.B) bleiben 8 h nach Bestrahlung in den Kontrollzellen 18,1 DSBs erhalten. Dagegen sind es 26,1 DSBs in Rad51-depletierten Zellen. So bleiben 8 DSBs mehr unrepariert als in Kontrollzellen. Dieser kleine Reparaturdefekt ist mit dem Reparaturdefekt von XRCC2- und Rad54-defizienten Zellen in der G2-Phase

4. Ergebnisse

vergleichbar (Abb. 4.11.). Die Ku80-Depletion verursacht in der Zelle in der G2-Phase einen stärkeren Reparaturdefekt, da 38,6 DSBs verbleiben. Der Ku80-Reparaturdefekt in der G2-Phase korreliert mit demjenigen von Ligase4-depletierten Zellen 8 h nach Bestrahlung (38,8 DSBs, Abb. 4.15.B) und bestätigt die dominante Funktion des NHEJ in der G2-Phase. In Rad51/Ku80-depletierten Zellen bleiben 38,6 DSBs erhalten. Die Rad51/Ku80-depletierten Zellen weisen ein ähnliches Reparaturverhalten wie Ku80-depletierte Zellen auf, somit zeigt auch die Depletion von Rad51 keine Auswirkung in der G2-Phase. Dies ist jedoch erstaunlich, da Rad51 in der G2-Phase eine Funktion übernimmt. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Rad51 und Ku80 am gleichen Reparaturweg in der G2-Phase beteiligt sind, was der Literatur widerspricht, da NHEJ und HR unterschiedliche Reparaturwege in der G2-Phase sind. Deswegen sollten weitere Experimente in anderen NHEJ/HR-defizienten Zellen durchgeführt werden.

4.5.2. DSB-Reparatur von Ligase4/Rad54-defizienten Zellen

Das erstaunliche ähnliche Reparaturverhalten von Ku80/Rad51- und Ku80-depletierten Zellen in der G2-Phase führte zur Vermutung, dass das Abschalten von Rad51 und damit der HR keine Auswirkung auf die DSB-Reparatur der doppelt depletierten Zellen hat. Um dies zu verifizieren, wurde die DSB-Reparatur anderer NHEJ/HR-defizienten Zellen untersucht. Analysiert wurde die DSB-Reparatur von Ligase4/Rad54-defizienten MEFs. Das MEF-Zellsystem bietet den Vorteil an, dass die zu untersuchenden Reparaturproteinen vollständig mutiert sind, sodass eine Restaktivität dieser Proteine, im Vergleich zu den siRNA-Experimenten vollständig ausgeschlossen werden kann.

Die Versuchsdurchführung und die Probenauswertung erfolgten analog zu den vorherigen Experimenten (Kap. 4.3.3.).

4. Ergebnisse

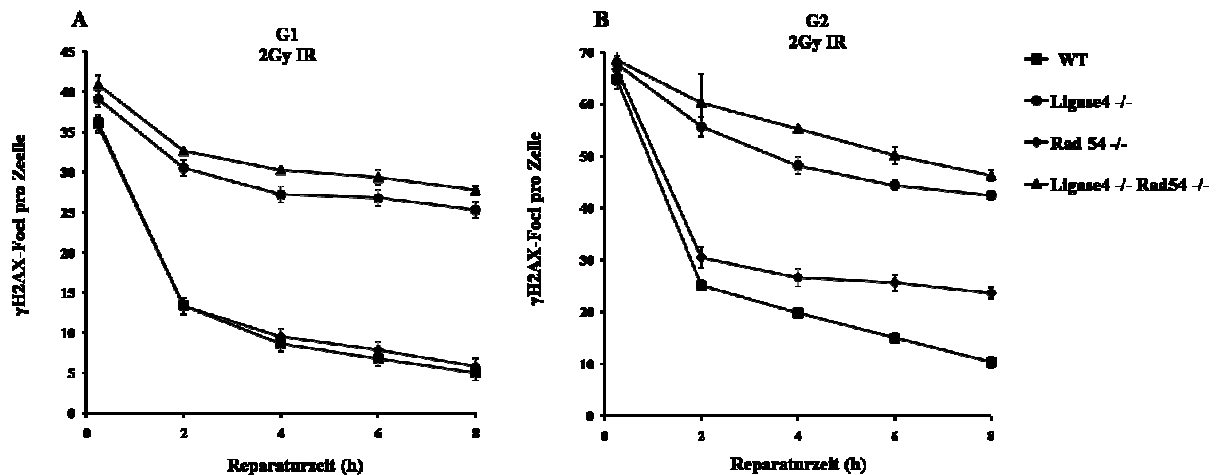


Abb. 4.18. DSB-Reparaturverhalten von Rad54/Ligase4-defizienten MEFs im Vergleich zu WT-, Rad54- und Ligase4-defizienten MEFs. Exponentiell wachsende Zellen wurden mit 2 Gy IR bestrahlt, mit Aphidicolin versetzt, für 0,25 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h zur Reparatur bei 37° C inkubiert und fixiert. Nach der Fixierung wurden die Zellen mit γ H2AX- und phosphoH3-spezifischen Antikörpern angefärbt. Die Anzahl an γ H2AX-Foci pro Zelle wurde in der G1- und der G2-Phase bestimmt. Die in unbestrahlten Proben ermittelten Kontrollwerte (0,5 Foci in G1, 9 Foci in G2) wurden von den Werten der bestrahlten Proben abgezogen. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler aus mindestens drei Experimenten. Die dargestellten WT-, Rad54- und Ligase4-Reparaturkurven wurden bereits in der Abb. 4.11. und 4.16. gezeigt.

Der WT und die Rad54-Mutante zeigen einen fast identischen Reparaturverlauf in der G1-Phase. Beide Zelllinien reparieren in dieser Zellzyklusphase 86 % bzw. 83 % ihrer strahleninduzierten DSBs (Kap. 4.3.5.1.). Dies ist für die Rad54-Mutante erwartungsgemäß, da Rad54 als HR-Protein keine Funktion in der G1-Phase übernimmt und das NHEJ den Hauptreparaturweg in der G1-Phase darstellt. Die Ligase4-Mutante weist eine Reparaturreffizienz von 36 % und damit einen stärkeren Reparaturdefekt in der G1-Phase auf (Kap. 4.4.3.). Dies ist bei der Ligase4-Mutante aufgrund des vollständig inaktivierten NHEJ zu erwarten. Auch bei der Doppelmutante ist ein sehr starker Reparaturdefekt nachweisbar. Tatsächlich verbleiben bei der Doppelmutante von 40 strahleninduzierten DSBs noch 26 DSBs. Somit wurden 33 % der DSBs beseitigt. Die Doppelmutante repariert ihre DSBs genauso effizient wie die Ligase4-Mutante. Dies ist erwartungsgemäß, da das NHEJ den Reparaturweg in der G1-Phase darstellt.

In der G2-Phase zeigen der WT und die Rad54-Mutante eine Reparaturreffizienz von 84 % bzw. 65 % (Kapitel 4.3.5.1.). Im Vergleich zu WT werden bei der HR-Mutante etwa 19 % DSBs weniger beseitigt. Dieser kleine Reparaturdefekt spiegelt den Anteil der HR an der Reparatur strahleninduzierten DSBs in der G2-Phase wider. Die Ligase4-Mutante weist eine Reparaturreffizienz von 38 % in der G2-Phase auf (Kapitel 4.4.3.). Im Vergleich zu WT bleiben bei der Ligase4-Mutante 46 % DSBs mehr unrepariert. Dies spiegelt auch den größeren Anteil des NHEJ an der DSB-Reparatur in der G2-Phase wider. Die Doppelmutante

4. Ergebnisse

kann 32 % der strahleninduzierten DSBs beseitigen, da 46 von den 68 anfänglichen DSBs erhalten bleiben. Damit zeigt die Doppelmutante eine um 6 % schlechtere Reparatureffizienz im Vergleich zur Ligase4-Mutante. Dieser erhöhte Reparaturdefekt kann auf die Abwesenheit von Rad54 zurückgeführt werden. Jedoch korreliert dieser Rad54-Reparaturdefekt nicht im Geringsten mit demjenigen, der in der alleinigen Rad54-Mutante beobachtet wird (19 %). Eine eindeutige Schlussfolgerung zur Wirkung von Rad54 und Ligase4 in unterschiedlichen Reparaturwegen in der G2-Phase kann somit nicht erfolgen. Vielmehr sieht es so aus, als ob der starke Ligase4-Reparaturdefekt den viel schwächeren Rad54-Defekt unterdrücken würde.

Die Ergebnisse der Ku80/Rad51- und Ligase4/Rad54-defizienten Zellen können keine Additivität des NHEJ und der HR in der G2-Phase nachweisen. Dieser Befund stimmt mit der Literatur nicht überein. Somit sollte die Reparatur weiterer Doppelmutanten analysiert werden, um eine sichere Aussage treffen zu können.

4.5.3. Epistasisanalysen mit dem DNA-PKcs-Inhibitor (DNA-PKi) bei Rad54-defizienten MEFs

Die vorherigen Reparaturexperimente in Doppelmutanten (Abb. 4.17. und 4.18.) in der G2-Phase lassen darauf schließen, dass in der G2-Phase eine deutliche Unterscheidung zwischen NHEJ und HR nicht erfolgen kann. Dies steht jedoch mit der Literatur im Widerspruch, denn dort wird beschrieben, dass NHEJ und HR unterschiedliche und wichtige Reparaturwege in der G2-Phase sind. Um diese Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weiter zu untersuchen, sollte in einem HR-defizienten Hintergrund ein Protein des NHEJ inhibiert werden. Analysiert wurde das Reparaturverhalten von Rad54-defizienten MEFs, in denen DNA-PKcs, ein NHEJ-Protein, zusätzlich inhibiert wurde.

Zur Versuchsdurchführung wurden exponentiell auf Deckgläschen wachsende MEFs 1 h vor Bestrahlung mit dem DNA-PKcs-Inhibitor (DNA-PKi) behandelt und bis zur Fixierung bei 37° C inkubiert. Die Antikörperfärbung der Zellen und die Fociauswertung erfolgten analog zu den vorher durchgeführten MEF-Experimenten (Kapitel 4.3.3.).

4. Ergebnisse

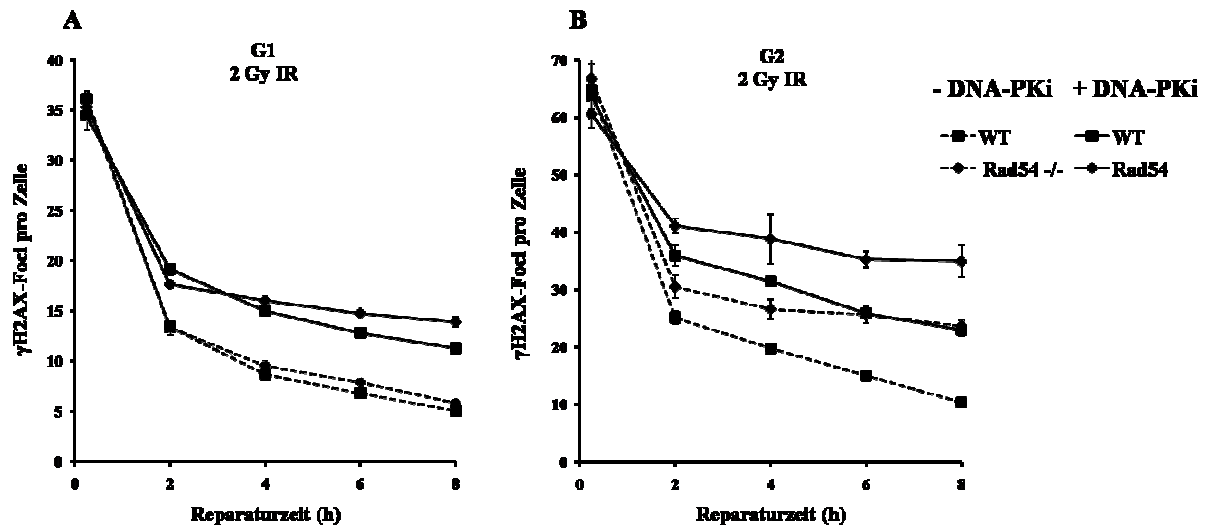


Abb. 4.19. DSB-Reparaturverhalten von Rad54-defizienten MEFs nach Behandlung mit dem DNA-PKcs-Inhibitor (DNA-PKi) in der G1 (A)- und G2 (B)-Phase. Exponentiell wachsende MEFs wurden vor der Bestrahlung mit 2 Gy IR mit bzw. ohne DNA-PKi behandelt. Danach wurden die Zellen für 15 min, 2 h, 4 h, 6 h und 8 h bei 37° C zur Reparatur inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und mit spezifischen γ H2AX- bzw. phosphoH3-Antikörpern angefärbt. Die in unbestrahlten Proben ermittelten Kontrollwerte (0,2–0,5 Foci in G1, 4–9 Foci in G2) wurden bereits von den dargestellten Fociwerten abgezogen. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler von mindestens zwei Experimenten dar. Die in der Abbildung gestrichelten Kurven repräsentieren die unbehandelten Zelllinien und wurden bereits in der Abb. 4.11. dargestellt. WT steht für H2AX WT.

In WT-Zellen werden durch Bestrahlung mit 2 Gy IR 36 DSBs induziert, 8 h danach verbleiben 11 DSBs in DNA-PKi-behandelten Zellen gegenüber 5 DSBs in unbehandelten Zellen (Abb. 4.19.A). Dies entspricht einer Reparaturfähigkeit von 69 % nach DNA-PKcs-Inhibition gegenüber 86 % in nicht inhibierten WT-Zellen. Somit wird die Reparaturkapazität der WT-Zellen nach DNA-PKi-Behandlung deutlich vermindert. Dies entspricht den Erwartungen, da das NHEJ in WT-Zellen inhibiert wurde und NHEJ der Hauptreparaturweg in der G1-Phase ist. Allerdings ist der in WT-Zellen simulierte NHEJ-Reparaturdefekt kleiner als erwartet. Tatsächlich wird trotz DNA-PKcs-Inhibition mehr als die Hälfte an DSBs beseitigt. Jedoch werden bei klassischen NHEJ-Mutanten in der G1-Phase deutlich weniger als 50 % der DSBs repariert (Kapitel 4.3.3.). In der Rad54-Mutante verbleiben von 36 induzierten DSBs 14 DSBs nach DNA-PKi-Behandlung bzw. 6 DSBs ohne Behandlung. Auch die Reparatureffizienz von Rad54-defizienten Zellen wird in der G1-Phase durch die DNA-PKcs-Inhibition von 83 % auf 61 % herabgesetzt. Dies geschieht auch in der HR-Mutante erwartungsgemäß, da das NHEJ und nicht die HR die Hauptreparaturfunktion in der G1-Phase übernimmt. Dennoch werden wie in WT-Zellen trotz der DNA-PKcs-Inhibition mehr als 50 % der DSBs entfernt. Die unerwartete kleine Wirkung von DNA-PKi könnte an der eingesetzten Konzentration des Inhibitors in MEF-Zellen liegen. Um den gewünschten Effekt zu erzielen, könnte für dieses Zellsystem eine höhere Konzentration erforderlich sein.

4. Ergebnisse

In der G2-Phase (Abb. 4.19.B) sind von 65 strahleninduzierten DSBs in WT-Zellen nur 10 DSBs nach 8 h Reparaturzeit vorhanden. Nach Behandlung mit DNA-PKi sind es noch 23 DSBs. Auch in der G2-Phase hat sich die Reparatureffizienz der WT-Zellen von 85 % auf 65 % nach DNA-PKi-Behandlung verschlechtert. Auch in der G2-Phase ist dieses Ergebnis zu erwarten, da das NHEJ in WT-MEFs durch Behandlung mit DNA-PKi inaktiviert wurde und NHEJ der dominierende Reparaturweg in der G2-Phase ist (Kap. 4.4.). Auch in der G2-Phase bekräftigt sich die Vermutung der ineffizienten Wirkung des DNA-PKcs-Inhibitors im MEF-Zellsystem, da mehr als 50 % der DSBs im Gegensatz zum Reparaturverhalten der klassischen NHEJ-Mutanten beseitigt werden (Kapitel 4.3.3.). Wie in der G1-Phase liegt es vermutlich an einer zu niedrig eingesetzten Konzentration des chemischen Inhibitors. Die Rad54-defizienten MEFs lassen nach Behandlung mit DNA-PKi 35 DSBs gegenüber 23,6 DSBs in unbehandelten Zellen unrepariert. Durch Bestrahlung werden 66 DSBs hervorgerufen. Die DSB-Reparaturkapazität von Rad54-defizienten Zellen wird durch das zusätzliche Ausschalten von DNA-PKcs von 64 % auf 47 % deutlich reduziert. Somit wird der Rad54-Reparaturdefekt nach der DNA-PKcs-Inhibition um 17 % zusätzlich erhöht. Dies korreliert mit dem Reparaturdefekt, was in WT-Zellen nach Behandlung mit DNA-PKi hervorgerufen wird (20 %). Somit addiert sich in der Rad54-Mutante der schon vorhandene HR-Reparaturdefekt mit dem NHEJ-Reparaturdefekt, der durch die zusätzliche Inhibition von DNA-PKcs hervorgerufen wurde. Dieser Effekt ist auch zu erwarten, da durch das Ausschalten von DNA-PKcs in den HR-defizienten Zellen das NHEJ zusätzlich inaktiviert wurde und somit zwei unabhängige Reparaturwege defekt sind.

Die Hemmung des DNA-PKcs führt in der Rad54-Mutante zu einer deutlichen Erhöhung des Reparaturdefekts in der G2-Phase. Dies zeigt, dass Rad54 und DNA-PKcs in der G2-Phase an unterschiedlichen Reparaturwegen beteiligt sind, was bereits in der Literatur beschrieben wurde (Shrivastav et al., 2008). Jedoch widersprechen diese Studien denjenigen, die in der vorliegenden Arbeit in Rad51/Ku80- und Rad54/Ligase4-defizienten Zellen beobachtet wurden (Abb. 4.17. und 4.18.). Um diese Diskrepanz aufklären zu können, wurden DNA-PKcs bzw. ATM, eine HR-Komponente in der G2-Phase (Abb. 4.12) in NHEJ-Mutanten inhibiert.

4.5.4 Epistasisanalysen mit dem ATM- und DNA-PKcs-Inhibitor bei NHEJ-Mutanten

In den folgenden Experimenten wurde ATM, eine Komponente der langsamen Reparatur in der G1- und der G2-Phase (Abb. 4.12.), in NHEJ-Mutanten inhibiert. Dabei sollte untersucht werden, ob die ATM-Inhibition das Reparaturverhalten der NHEJ-Mutanten in der G2-Phase

4. Ergebnisse

beeinflusst. Die Inhibition von DNA-PKcs in NHEJ-defizienten Zellen diene als Kontrolle, da DNA-PKcs ein NHEJ-Protein ist, und damit sollte es keinen Einfluss auf das Reparaturverhalten der NHEJ-Mutanten haben.

4.5.4.1. DSB-Reparaturverhalten von XLF-defizienten primären menschlichen Fibroblasten nach ATM- und DNA-PKcs-Inhibition

Um das Ausmaß der DSB-Reparatur in NHEJ/HR-defizienten Zellen weiter zu verfolgen, insbesondere in der G2-Phase, wurde das DSB-Reparaturverhalten von XLF-defizienten Zellen, in denen ATM bzw. DNA-PKcs inhibiert wurde, analysiert.

Zur Versuchsdurchführung wurden exponentiell auf Deckgläschen wachsende Zellen 1 h vor Bestrahlung mit ATMi bzw. DNA-PKi behandelt und bis zur Fixierung bei 37° C inkubiert. Die Antikörperfärbung der Zellen und die Fociauswertung erfolgten analog zu den vorher beschriebenen Experimenten (Kap. 4.2.2.).

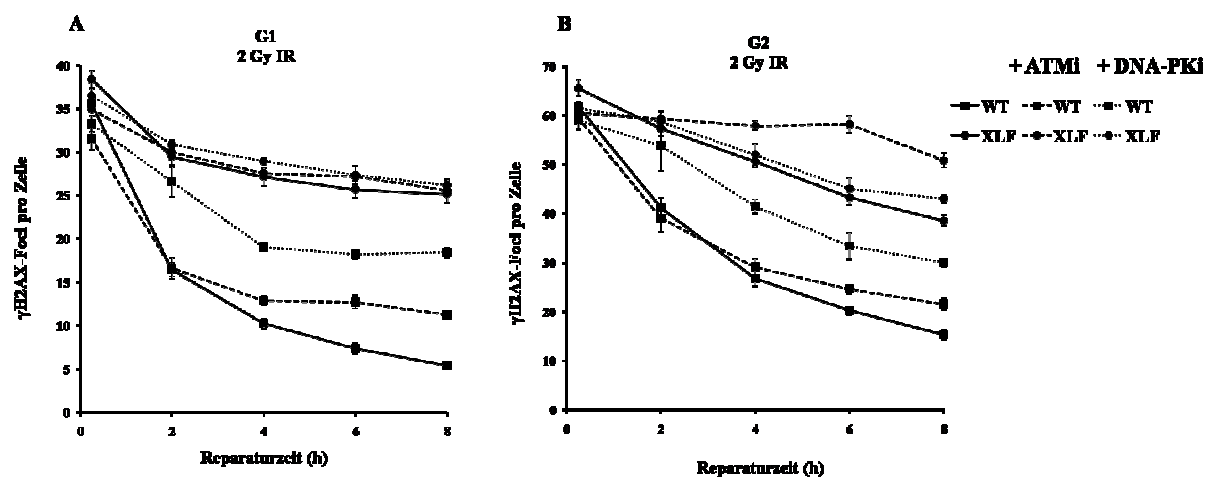


Abb. 4.20. DSB-Reparaturverhalten von immortalisierten primären humanen WT- und XLF-defizienten Fibroblasten nach Behandlung mit dem ATM (ATMi)- bzw. DNA-PKcs (DNA-PKi)-Inhibitor in der G1 (A)- und G2 (B)-Phase. Exponentiell wachsende Zellen wurden 1 h vor Bestrahlung mit 2 Gy IR mit dem ATM- (ATMi) bzw. DNA-PKcs- (DNA-PKi) Inhibitor versetzt und für 15 min, 2 h, 4 h, 6 h und 8 h zur Reparatur bei 37° C inkubiert. Nach der Fixierung wurden die Zellen mit γ H2AX- und CENP-F-spezifischen Antikörpern angefärbt und unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Die in unbestrahlten Proben ermittelten Kontrollwerte (0,2-0,5 Foci in G1, 2-5 Foci in G2) wurden von den dargestellten Fociwerten abgezogen. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler aus vier Experimenten dar. Die in der Abbildung ungestrichelten Linien stellen die Reparaturkurven von unbehandelten Zellen dar und wurden bereits in der Abb. 4.14. dargestellt.

In der G1-Phase (Abb. 4.20.A) werden in immortalisierten menschlichen WT-Zellen 35 DSBs durch Bestrahlung induziert, von denen nach 8 h 5 DSBs unrepariert verbleiben. Somit werden in WT-Zellen 85 % der DSBs beseitigt (Kap. 4.4.1.). Durch ATMi-Behandlung sind in WT-Zellen nach 8 h Reparaturzeit noch 11 DSBs vorhanden. Dies entspricht einer

4. Ergebnisse

Reparatureffizienz von 68 %. Die ATM-Inhibition verschlechtert die DSB-Reparatur von WT-Zellen um 17 %. Dies korreliert mit dem bereits gezeigten Reparaturdefekt einer ATM-Mutante (Kap. 4.3.1. und 4.3.3.). In einer XLF-Mutante verbleiben von 38 strahleninduzierten DSBs 25 DSBs. Die ATM-Inhibition verursacht keinen zusätzlichen Reparaturdefekt bei der XLF-Mutante. Diese Beobachtungen sind mit der Annahme vereinbar, dass ATM, obwohl kein klassisches NHEJ-Protein, zum NHEJ in der G0/G1-Phase gehört (Riballo et al., 2004; Abb. 4.7. und 4.9.).

In WT-Zellen verbleiben 18,5 DSBs in DNA-PKi-behandelten Zellen statt 5,4 DSBs in unbehandelten Zellen (Abb. 4.20.A). Somit wird die Reparetureffizienz von 85 % auf 43 % gesenkt. Der durch die DNA-PKcs-Inhibition hervorgerufene starke Reparaturdefekt bei WT-Zellen korreliert mit dem Reparaturdefekt einer DNA-PKcs-Mutante in der G1-Phase (Kap. 4.4.3.). 8 h nach Bestrahlung bleiben 26 DSBs in der DNA-PKi-behandelten bzw. 25 DSBs in der unbehandelten XLF-Mutante erhalten. Die Inhibition von DNA-PKcs verursacht in der G1-Phase keinen zusätzlichen Reparaturdefekt in XLF-defizienten Zellen. Dieses Ergebnis ist erwartungsgemäß, da XLF und DNA-PKcs als klassische NHEJ-Komponente an dem gleichen Reparaturweg beteiligt sind.

In der G2-Phase (Abb. 4.20.B) werden in WT-Zellen 62 DSBs induziert, und davon bleiben 15 DSBs bzw. 21 DSBs nach Behandlung mit ATMi unrepariert. Die Reparetureffizienz wird von 76 % auf 66 % vermindert. Somit verursacht die Inhibition von ATM auch eine Verminderung der DSB-Reparatur von WT-Zellen in der G2-Phase. Interessanterweise ist eine Erhöhung des schon starken Reparaturdefekts der XLF-Mutante nach ATMi-Behandlung zu beobachten, denn 8 h nach Bestrahlung verbleiben von 65 induzierten DSBs 51 DSBs nach der ATM-Inhibition gegenüber 38 DSBs in nicht inhibierten Zellen. Die stark verminderte Reparaturkapazität der XLF-Mutante wird durch die Wirkung von ATMi von 41 % auf 22 % noch zusätzlich reduziert. Diese Beobachtung zeigt, dass ATM und XLF an unterschiedlichen Reparaturwegen in der G2-Phase beteiligt sind. Dieses Ergebnis ist konsistent mit der Zuordnung von ATM zur HR in der G2-Phase (Abb. 4.12.).

In der G2-Phase (Abb. 4.20.B) lassen die DNA-PKi-behandelten WT-Zellen 30 statt 15 DSBs in unbehandelten Zellen unrepariert, was eine Verschlechterung der Reparatur von 76 % auf 52 % zur Folge hat. Letztere korreliert auch mit der Reparetureffizienz der DNA-PKcs-Mutante in der G2-Phase (Kap. 4.4.3.). Die Inhibition der DNA-PKcs zeigt im beobachteten Zeitraum keinen wesentlichen Einfluss auf das Reparaturverhalten der XLF-Mutante. Es verbleiben 43 DSBs in DNA-PKi-behandelten XLF-defizienten Zellen gegenüber 38,6 DSBs

4. Ergebnisse

in unbehandelten Zellen. Allerdings ist dieser Unterschied (4,4 DSBs) nicht mit demjenigen vergleichbar, der durch die DNA-PKcs-Inhibition in WT-Zellen (15 DSBs) hervorgerufen wird. Die geringe Zunahme nach Inhibition von DNA-PKcs in XLF-Mutanten bestätigt, dass XLF und DNA-PKcs epistatisch in der G2-Phase sind.

Die Erhöhung des XLF-Reparaturdefekts nach der ATM-Inhibition zeigt, dass ATM und XLF an getrennten Reparaturwegen in der G2-Phase beteiligt sind. Dies untermauert die Zuordnung von ATM als HR-Komponente in der G2-Phase (Abb. 4.12) und ist konsistent mit der Erhöhung des Reparaturdefekts in der Rad54-Mutante in der G2-Phase nach Inhibition von DNA-PKcs (Abb. 4.19.). Zur Unterstützung dieses Befunds wurden analoge Experimente in Ligase4-defizienten Zellen durchgeführt.

4.5.4.2. DSB-Reparaturverhalten von Ligase4-defizienten MEFs nach ATM- und DNA-PKcs-Inhibition

Durchgeführte Studien mit ATMi und DNA-PKi in der XLF-Mutante haben den Befund in HR-defizienten Zellen untermauert, dass ATM in der G2-Phase eine HR-Komponente ist und dass die doppelte Inhibition von HR und NHEJ einen doppelten Reparaturdefekt verursacht. Um dies weiterhin zu unterstützen, wurde auch das DSB-Reparaturverhalten in einer weiteren NHEJ-Mutante, den Ligase4-defizienten Zellen, nach Inhibition von ATM und DNA-PKcs analysiert.

Die Versuchsdurchführung erfolgte analog zu derjenigen in der XLF-Mutante (Kap. 4.5.4.1.). Die Antikörperfärbung und die Fociauswertung erfolgten wie im Kap. 4.3.3. beschrieben.

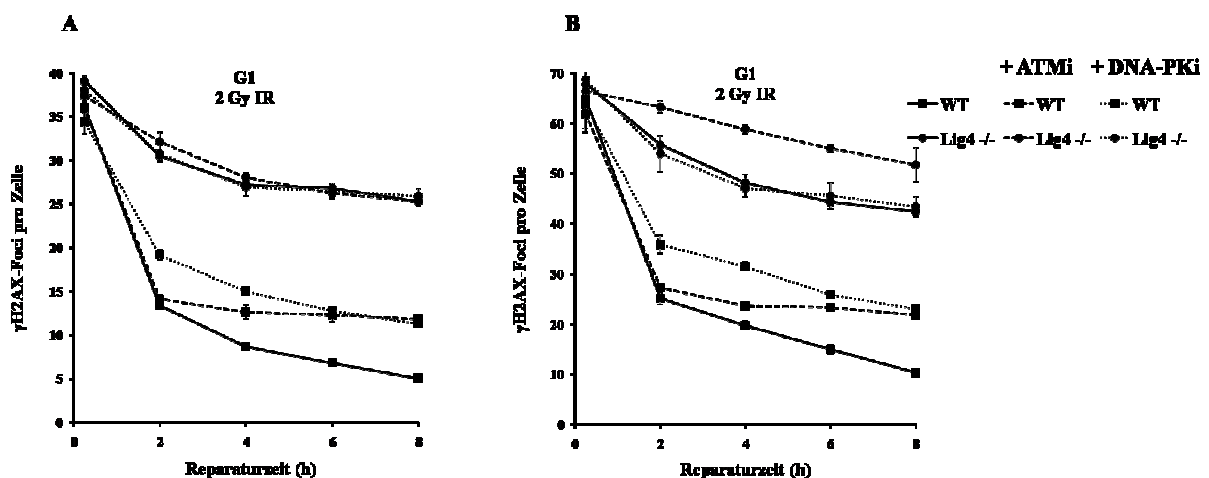


Abb. 4.21. DSB-Reparaturverhalten von murinen embryonalen Ligase4-defizienten Fibroblasten in der G1 (A)- und G2(B)-Phase nach Behandlung mit dem ATM- und DNA-PKcs-Inhibitor. Exponentiell wachsende Zellen wurden 1 h vor Bestrahlung mit dem ATM- bzw. DNA-PKcs-Inhibitor versetzt und danach

4. Ergebnisse

mit Aphidicolin für 15 min, 2 h, 4 h, 6 h und 8 h zur Reparatur bei 37° C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und mit γ H2AX- und phosphoH3-spezifischen Antikörpern angefärbt. Die Auszählung der γ H2AX-Foci in der G1- und G2-Phase erfolgte im Fluoreszenzmikroskop. Die in unbestrahlten Proben ermittelten Kontrollwerte (0,2-0,5 Foci in G1, 6-10 Foci in G2) wurden von den dargestellten Werten abgezogen. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler aus mindestens vier Experimenten. Die in der Abbildung ungestrichelten Reparaturkurven entsprechen den unbehandelten Zelllinien und wurden bereits in der Abb. 4.16. dargestellt. WT steht für H2AX WT.

In der G1-Phase (Abb. 4.21.A) verbleiben in ATMi-behandelten WT-Zellen 8 h nach Bestrahlung mit 2 Gy IR 11 DSBs statt 5 DSBs in unbehandelten Zellen (Kap. 4.3.5.2.). Die Inhibition von ATM verursacht somit eine Verschlechterung der DNA-Reparatur und damit einen Reparaturdefekt bei WT-MEFs. In Ligase4-defizienten Zellen bleiben sowohl ohne als auch mit ATM-Inhibition 25 DSBs von 39 induzierten DSBs erhalten. Die ATM-Inhibition hat somit keinen Einfluss auf das Reparaturverhalten. Dieses Ergebnis ist mit der Zuordnung von ATM zum NHEJ in der G0/G1-Phase vereinbar (Riballo et al., 2004, Abb 4.12.).

Die DSB-Reparatur in WT-Zellen wird auch durch die Inhibition von DNA-PKcs in der G1-Phase vermindert. 11 DSBs bleiben in DNA-PKi-behandelten WT-MEFs gegenüber 5 DSBs in unbehandelten Zellen erhalten (Kap. 4.5.3.). Die Behandlung von der Ligase4-Mutante mit DNA-PKi hat im untersuchten Zeitraum keinen Einfluss auf deren Reparaturverhalten. Sowohl in der DNA-PKi-behandelten Ligase4-Mutante als auch in der unbehandelten Mutante verbleiben 25 DSBs. Dies entspricht den Erwartungen, da DNA-PKcs und Ligase4 als klassische NHEJ-Proteine an einem gemeinsamen Reparaturweg beteiligt sind.

Die Inhibition von ATM verursacht eine Verschlechterung der DSB-Reparatur bei WT-MEFs in der G2-Phase (Abb. 4.21.B). Diese lassen nach ATMi-Behandlung 21 DSBs gegenüber 10 DSBs in unbehandeltem Zustand unrepariert (Kap. 4.3.5.2.). Interessanterweise erhöht sich der starke Reparaturdefekt der Ligase4-Mutante nach deren Behandlung mit ATMi. 8 h nach Bestrahlung verbleiben von 68 induzierten DSBs 52 DSBs nach ATMi-Behandlung gegenüber 42 DSBs in der unbehandelten Mutante. Das Ausmaß des durch ATMi verstärkten Reparaturdefekts in der Ligase4-Mutante (10 DSBs) korreliert nahezu mit demjenigen in ATMi-behandelten WT-Zellen (11 DSBs). Dies zeigt, dass ATM und Ligase4 in der G2-Phase an unterschiedlichen Reparaturwegen beteiligt sind.

Der DNA-PKcs-Reparaturdefekt wird in WT-Zellen simuliert (Abb. 4.21.B). Nach Behandlung mit DNA-PKi sind 23 DSBs gegenüber 10 DSBs in unbehandelten Zellen 8 h nach Bestrahlung vorhanden (Kap. 4.5.3.). In einer Ligase4-Mutante hat die Inhibition von DNA-PKcs keine Auswirkung auf die DSB-Reparatur in der G2-Phase. So verbleiben 43

4. Ergebnisse

DSBs nach DNA-PKi-Behandlung bzw. 42 DSBs in unbehandeltem Zustand unrepariert. Dies liegt an der Zugehörigkeit von Ligase4 und DNA-PKcs zum NHEJ.

Die Inhibition von ATM verursacht eine Erhöhung des Ligase4-Reparaturdefekts in der G2-Phase. Auch hier wird gezeigt, dass ATM und Ligase4 getrennte Wege in der G2-Phase sind. Dies bestätigt die Ergebnisse der ATM-Inhibition in der XLF-Mutante (Abb. 4.21.). Die Ergebnisse der Abb. 4.19., 4.20. und 4.21. zeigen, dass die doppelte NHEJ/HR-Defizienz einen doppelten Reparaturdefekt in der G2-Phase verursacht. Diese stehen im Widerspruch mit denjenigen in der Abb. 4.17. und 4.18. Mögliche Gründe für diesen Widerspruch werden in dem Diskussionsteil dieser Arbeit erwähnt. Dennoch kann die Zelle einen minimalen Anteil an DSBs in der G2-Phase trotz Inhibition beider Hauptreparaturwege beseitigen. Dies lässt vermuten, dass andere Reparaturmechanismen in der Abwesenheit des NHEJ und die HR für die DSB-Reparatur einer Untermenge an DSBs zuständig sind.

Zusammengefasst sind zur Reparatur von durch Röntgenstrahlung verursachte DSBs zwei Hauptreparaturwege vorhanden: das NHEJ und die HR. Das NHEJ ist der dominierende Reparaturweg sowohl in der G1- als auch in der G2-Phase, da mehr als 50 % der DSBs in NHEJ-Mutanten unrepariert bleiben (Kap. 4.4.). Dagegen zeigen HR-Mutanten keinen Defekt in der G1-Phase und können dennoch mehr als 50 % der DSBs in der G2-Phase beseitigen (Kap. 4.3.5.). Somit übernimmt HR in der G1-Phase keine Funktion und spielt eher eine untergeordnete Rolle in der G2-Phase. In NHEJ-Mutanten ist die schnelle Reparatur beeinträchtigt, somit stellt das NHEJ eine schnelle Komponente dar. In der G2-Phase wird nur eine Minorität an DSBs erst nach längeren Zeiten mit einer langsameren Kinetik repariert. In der G2-Phase zeigen HR-Mutanten einen kleinen Reparaturdefekt zu späteren Zeiten, deswegen ist HR ein langsamer Reparaturweg (Kap. 4.4.4.). ATM, Artemis, MDC-1 und 53BP1 spielen eine bedeutende Rolle bei der langsamen Reparaturkomponente in der G1- und der G2-Phase. Sie werden für die Reparatur von 15–19 % der DSBs benötigt (Kap. 4.3.3.). Allerdings erfordert die Reparatur solcher DSBs in der G1- und der G2-Phase unterschiedliche Reparaturmechanismen. In der G1-Phase läuft deren Reparatur über NHEJ, wohingegen in der G2-Phase die HR benötigt wird.

5. Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Reparatur von strahleninduzierten DSBs bei verschiedenen mutierten Zelllinien in der G1- und G2-Phase des Zellzyklus analysiert. Diese Untersuchungen sollten Rückschlüsse auf die Bedeutung der einzelnen Reparaturproteine und der Anteil des NHEJ bzw. der HR an der strahleninduzierten DSB-Reparatur ermöglichen. In dieser Arbeit wurden DSBs durch Röntgenstrahlung erzeugt. Diese zählt zu den dünn ionisierenden Strahlungsarten und dadurch werden die entstandenen DSBs homogen im Zellkern verteilt. Zur Untersuchung der Reparatur von DSBs, wurde die γ H2AX-Immunfluoreszenzmikroskopie angewendet. Um dabei G1- und G2-Zellen voneinander unterscheiden zu können, wurden die Zellzyklusmarker CENP-F und phosphoH3 verwendet. Diese Zellzyklusmarker wurden in unterschiedlichen Spezies angewendet und markieren spezifisch die G2-Zellen (Abb. 4.1. und 4.2.). Die G1-Zellen zeigen weder für CENP-F noch für phosphoH3 ein positives Signal (Abb. 4.1. und 4.2.). Durch Bestrahlung werden in den Zellen Checkpoints aktiviert, die das Übertreten von geschädigten Zellen zur nächsten Zellzyklusphase verhindern können. Für die Untersuchung der G2-Zellen ist der Ausschluß der S-Phase besonders wichtig. In der S-Phase gibt es den intra S-Checkpoint. Dieser verhindert den Durchgang von S-Zellen in die G2-Phase durch Verlangsamen der DNA-Replikation. Allerdings wird dieser Effekt bei Dosen < 5 Gy nicht erreicht (Merrick et al., 2004). Die in dieser Arbeit verwendete Dosis betrug 2 Gy, somit kann die vollständige Aktivierung der intra S-Checkpoint nicht gewährleistet werden. Um den Übertritt bestrahlter S-Zellen in die G2-Phase zu verhindern, wurde Aphidicolin, ein Hemmer der DNA-Polymerasen α und δ angewendet. Bei der Reparaturanalyse von G1-Zellen könnte zu späteren Zeitpunkten eine mögliche Durchmischung mit bestrahlten G2/M-Zellen nicht ausgeschlossen werden. Ein Vergleich der Reparaturwerte von G1- und G2-Zellen zeigte jedoch keinen wesentlichen Unterschied (Abb. 4.4.A und 4.4.B), somit kann angenommen werden, dass die Mehrheit der ausgewerteten G1-Zellen zur Zeit der Bestrahlung in der G1-Phase waren.

Die Verwendung von Inhibitoren der Replikation wie Aphidicolin verursacht die Phosphorylierung von H2AX in der S-Phase (Kurose et al., 2006). Da in der vorliegenden Arbeit die Reparatur in der G1- und G2-Phase im Mittelpunkt der Untersuchungen stand, ist die Phosphorylierung von H2AX durch Aphidicolin außer Acht zu lassen. Baumstark et al.,

5. Diskussion

(1991) zeigten, dass die Anwesenheit von Aphidicolin jedoch zu einer verminderten Reparaturfähigkeit von Strangbrüchen führt. Dieser Effekt ist von der Konzentration der Chemikalie und der Inkubationszeit abhängig. In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch kein Einfluss von Aphidicolin auf das Reparaturverhalten von WT-Zellen festgestellt werden (Abb. 4.4.). Da in den hier durchgeführten Experimenten nur eine Endkonzentration von 1 µg/ml verwendet wurde, und in Baumstark et al. gezeigt wurde, dass der Effekt mit der Konzentration des Inhibitors zunimmt, scheint die hier verwendete Konzentration diesen Effekt noch nicht auszulösen.

Im folgenden Kapiteln werden die einzelnen Ergebnisse im Vergleich mit der relevanten Literatur diskutiert und anschließend zusammengefasst.

5.1. Vor- und Nachteile der γ H2AX-Foci als Marker von DSBs

Im Rahmen dieser Arbeit wurde vor allem die γ H2AX-Immunfluoreszenzmikroskopie zur Untersuchung der DSB-Reparatur strahleninduzierter DSBs verwendet. Dabei wurde die Anzahl an γ H2AX-Foci im Zellkern bestimmt. Jeder γ H2AX-Focus stellt ein DSB dar (Sedelnikova et al., 2002; Rothkamm und Löbrich, 2003). Es wird allgemein angenommen, dass die Quantifizierung von γ H2AX-Foci eine sehr sensitive Methode zur Quantifizierung von DSBs nach Einwirkung von ionisierender Strahlung darstellt (Fernandes Capetillo et al., 2004). Die DSB-Reparaturanalyse der untersuchten Zelllinien und vor allem der WT-Zellen zeigt, dass die Anzahl an γ H2AX-Foci mit zunehmender Inkubationszeit abnimmt (Abb 4.7., 4.9., 4.14.). Dies korreliert mit der Reparatur von DSBs in der Zelle mit zunehmender Zeit. WT-Zellen sind in der Lage die strahleninduzierten DSBs effizient zu beseitigen, denn die Anzahl der γ H2AX-Foci ist nach 8 h Inkubationszeit sehr gering. In Zelllinien mit Defizienzen von Reparaturproteinen ist die verbliebene γ H2AX-Focizahl relativ hoch (HR-Mutanten, Abb 4.11.) oder sehr hoch (NHEJ-Mutanten, Abb. 4.13., 4.14., 4.16.). Diese Ergebnisse beweisen, dass die Kinetik der γ H2AX-Foci zur Analyse der DSB-Reparatur in unterschiedlichen Zelllinien geeignet ist. Die γ H2AX-Immunfluoreszenzmikroskopie kann auch in klinischen Studien verwendet werden, um die Empfindlichkeit der Zellen auf die Krebstherapie wie z.B. auf die Chemotherapie und die Radiotherapie vorherzusagen. Dazu werden Proben von verschiedenen Krebspatienten sowie von Kontrollpersonen auf die Reparatur von strahleninduzierten DSBs getestet. In manchen Fällen reagierten Krebspatienten sehr empfindlich auf die Strahlung, so zeigten ihre Zellen eine stark verminderte DSB-Reparatur gegenüber Zellen gesünder Patienten (Löbrich et al., 2005).

5. Diskussion

Allerdings stößt die γ H2AX-Immunfluoreszenzmikroskopie in bestimmten Fällen an ihre Grenze. Bei allen untersuchten Reparaturzeiten war das γ H2AX-Immunfluoreszenzsignal von der MDC-1-Mutante sehr schwach, so dass die Quantifizierung der γ H2AX-Foci dabei erschwert wurde. So lassen sich die γ H2AX-Foci in der MDC-1-Mutante nicht ohne Schwierigkeiten bestimmen (Kap. 4.3.3., Abb. 4.9.). Der Induktionswert einer MDC-1-Mutante in der G1- und G2-Phase war stets niedriger als der von WT-Zellen (Abb. 4.9.). Höchstwahrscheinlich liegt es daran, dass MDC-1 mit γ H2AX interagiert. Diese Wechselwirkung verstärkt das γ H2AX-Signal am Ort des DSBs, was zum Einen die Schadensantwort beschleunigt (Lou et al., 2006; Stucki et al., 2005), und zum Anderen die Auswertung des γ H2AX-Signals nach Immunfluoreszenzfärbung erleichtert. Der Induktionswert der ATM-Mutante war im Vergleich zu demjenigen von WT-Zellen ebenfalls niedriger (Abb. 4.7., 4.9.). Dies wurde bereits in Studien von Kühne et al., (2004) beobachtet. Dies liegt daran, dass H2AX sowohl von ATM als auch von DNA-PKcs phosphoryliert wird (Stift et al., 2004; Wang et al., 2005). In der Abwesenheit von ATM wird H2AX durch DNA-PKcs phosphoryliert aber dies benötigt eine längere Zeit. Dies hat zur Folge, dass die Induktion von Zelllinien mit simultanen Defizienzen in ATM und DNA-PKcs mit dieser Methode nicht ausgewertet werden kann.

Außerdem ist die Reproduzierbarkeit dieser Methode vom Operator abhängig. Beispiele dafür sind die Protokolle, die für die Immunfluoreszenzfärbung in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden. In MEFs war mit der Methanol/Aceton-Fixierung deutlich schönere ausgebildete Foci zu sehen, während bei menschlichen Zellen die Formaldehyd/Triton X-100-Fixierung schönere Foci erzielte. Aber auch Unterschiede in der optischen Auflösung und der Belichtung des Mikroskops können die Detektion von kleinen Foci beeinträchtigen. Deswegen wurden DSB-Reparaturstudien in unserem Labor möglichst mit demselben Gerät und gleichen Einstellungen durchgeführt. Bei Dosen über 4 Gy ist das manuelle Auszählen von Foci nicht mehr möglich, da es zu einer Sättigung der γ H2AX-Moleküle kommt. In diesem Fall kann das Reparaturverhalten erst nach längeren Inkubationszeiten analysiert werden.

Zusammengefasst ist die γ H2AX-Immunfluoreszenzmikroskopie geeignet, um die DSB-Reparatur in der Zelle bei Dosen ≤ 2 Gy einwandfrei verfolgen zu können. Bei höheren Dosen kommt es zu einer Sättigung der γ H2AX-Moleküle und die Genauigkeit der Auswertung kann zu den kürzeren Reparaturzeiten nicht mehr gewährleistet werden. Die Reparatur von Zelllinien mit Defizienzen in Reparaturproteinen, die mit γ H2AX direkt wechselwirken, unter

5. Diskussion

anderem MDC-1 und teilweise ATM, soll mit dieser Methode voll Bedacht durchgeführt werden.

5.2. Analyse der Reparaturreffizienz der unterschiedlichen WT-Zelllinien

In dieser Arbeit wurde die DSB-Reparatur von unterschiedlichen WT-Zelllinien untersucht. Diese zeigen einige Abweichungen in ihrem Reparaturverhalten. Primäre menschliche WT-Fibroblasten wie MRC-5 und HSF-1 zeigen eine Reparaturreffizienz von 90 % in der G1- und 84 % in der G2-Phase (Kap. 4.3.1, Abb. 4.7.). Im Vergleich dazu weisen immortalisierte primäre menschliche WT-Fibroblasten wie 82-6 hTert eine Reparaturreffizienz von 85 % in der G1- und 76 % in der G2-Phase auf (Kap. 4.4.1, Abb. 4.14.). Im Unterschied zu MRC-5 und HSF-1 wird 82-6 hTert mit der katalytischen Einheit des Telomerase-Gens transfiziert. Die Expression dieser katalytischen Einheit wirkt der Telomereverkürzung als Folge des Zellalterungsprozesses entgegen und damit können die Zellen länger kultiviert werden. Diese Unterschiede in der Reparaturreffizienz beider menschlichen WT-Fibroblasten deuten darauf hin, dass die Veränderung des genetischen Hintergrunds einen Effekt auf das Reparaturvermögen der Zelle haben könnte. Es hieße, dass die Immortalisierung der menschlichen Fibroblasten aufgrund deren Transfektion mit der katalytischen Untereinheit des Telomerase-Gens eine negative Auswirkung auf ihrer Reparaturreffizienz, möglicherweise durch Modifikation des Chromosomensatzes, hätte. Jedoch belegt eine Studie, dass die Immortalisierung dieser Zellen zu keiner chromosomalen Instabilität führt (Sharma et al., 2003). Einige Reparaturproteine wie Ku70 und Ku80 assoziieren mit den Telomeren und spielen eine Rolle in der Telomerestabilität (Gravel und Wellinger, 2002; Baumann und Cech, 2000). Es könnte durchaus möglich sein, dass die Überexpression der Telomerase die Bindung von Ku70/Ku80 zu den Telomeren vermindert und dadurch einen negativen Einfluss auf die DSB-Reparatur hat. Dies könnte erklären, warum die Reparaturreffizienz der 82-6 hTert-Zellen niedriger als die von nicht immortalisierten menschlichen Fibroblasten MRC-5 und HSF-1 in der vorliegenden Arbeit ist. Andere Studien widersprechen dieser Annahme (Rubio et al., 2002; Kampinga et al., 2004). So zeigten diese Autoren, dass die DSB-Reparatur nach Gamma-Strahlung in immortalisierten hTert- und normalen Hautfibroblasten ähnlich war. Das unterschiedliche Reparaturvermögen zwischen den hier untersuchten menschlichen Fibroblasten könnte auch an unterschiedlichen Strahlensensitivitäten dieser Zellen liegen. Tatsächlich korreliert die Strahlensensitivität einer Zelllinie meist mit ihrem Reparaturvermögen (Saleh und El-Awady, 2005; Schwartz et al., 1996). Je sensibler eine

5. Diskussion

Zelle gegenüber ionisierender Strahlung ist, desto schlechter kann sie DSBs beseitigen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden jedoch keine Überlebensexperimente von beiden menschlichen WT-Fibroblasten durchgeführt, um diese Annahme verifizieren zu können.

Die untersuchten menschlichen WT-Fibroblasten zeigen untereinander eine bis zu 10 %ige Abweichung in ihr DSB-Reparaturverhalten. Dies hat zur Folge, dass der beobachtete Reparaturdefekt von XLF-Mutanten gegenüber WT-Zellen in immortalisierten menschlichen Fibroblasten kleiner ist als in nicht immortalisierten menschlichen Fibroblasten (vergleiche Abb. 4.13. und 4.14.).

5.3. DSB-Reparatur: NHEJ versus HR

5.3.1. Der Anteil von NHEJ und HR an der Reparatur von strahleninduzierten DSBs

Die Reparatur strahleninduzierter DSBs läuft über das NHEJ und die HR ab. Beide Reparaturwege lassen sich durch ihre Spezifität und Aktivität charakterisieren. In der vorliegenden Arbeit wurde die DSB-Reparatur von NHEJ- und HR-Mutanten analysiert, um den genauen Anteil beider Mechanismen an der DSB-Reparatur in der G1- und besonders in der G2-Phase bestimmen zu können.

In der G1-Phase zeigen Mutanten des NHEJ bereits zu frühen Reparaturzeiten einen sehr starken Reparaturdefekt (Abb. 4.13.A, 4.14.A, 4.15A und 4.16.A), denn mehr als 50 % der strahleninduzierten DSBs bleiben unrepariert. Dies deutet darauf hin, dass das NHEJ den größten Anteil an der DSB-Reparatur in der G1-Phase hat. Diese Ergebnisse sind konsistent mit anderen Studien, die zeigten, dass NHEJ-Mutanten in der G1- und frühen S-Phase am stärksten strahlenempfindlich waren (Rothkamm et al., 2003; Hinz et al., 2005). NHEJ-Mutanten verfügen über eine effiziente HR, dennoch ihr großer Reparaturdefekt in der G1-Phase weist darauf hin, dass sie in der G1-Phase nicht aktiv ist. Tatsächlich wurde gezeigt, dass HR-defiziente Hamster CHO-Zellen in der G1-Phase am stärksten strahlenresistent waren (Rothkamm et al., 2003; Hinz et al., 2005). Dies korreliert mit der normalen DSB-Reparatureffizienz von HR-defizienten Zellen in der G1-Phase (Abb. 4.11.A). Es wird angenommen, dass die HR in der G1-Phase in Säugerzellen unterdrückt wird (Sonoda et al., 2006; Shrivastav et al., 2008). Dies lässt sich damit erklären, dass in der G1-Phase keine Schwesterchromatid zur Verfügung steht und somit HR unwahrscheinlich ist. Auf der anderen Seite hätte die Zelle in der G1-Phase theoretisch die Möglichkeit, das homologe Chromosom als Matrize für die Reparatur des geschädigten Strangs zu verwenden, aber homologe

5. Diskussion

Chromosomen, im Gegensatz zu Schwesterchromatiden, zeigen zueinander keine 100 %ige Übereinstimmung. Somit könnte die Gefahr einer Genkonversion, die zu chromosomalen Rearrangements führen könnte, nicht vollständig abgeschlossen werden. Die Verwendung von homologen Sequenzen wäre auch möglich für die Zelle in der G1-Phase. Tatsächlich verfügt das Genom von Säugern über zahlreiche wiederholende Sequenzen. Jedoch wurde gezeigt, dass pflanzliche und tierische Zellen homologe Sequenzen nur selten verwenden (Johnson und Jasin, 2000; Puchta et al., 2005; Shalev et al., 1997). Dies hat zur Folge, dass ungeeignete Rekombination, die zu genomischen Rearrangements und die Karzinogenese führen könnte, somit deutlich reduziert wird.

In der G2-Phase sind sowohl NHEJ als auch HR aktiv. Dadurch kann vermutet werden, dass beide Reparaturmechanismen einen ähnlichen Anteil an der DSB-Reparatur übernehmen. Jedoch weisen NHEJ-Mutanten auch einen starken Reparaturdefekt in der G2-Phase auf (Abb. 4.13.B, 4.14.B, 4.15.B und 4.16.B). Im Vergleich dazu zeigen HR-Mutanten einen weitaus geringeren Reparaturdefekt (Abb. 4.11.B, 4.17.B). Alle untersuchten NHEJ-defizienten Fibroblasten mit Ausnahme der Ligase4-defizienten MEFs weisen eine um bis zu 8 % verbesserte Reparaturreffizienz in der G2- verglichen zu der G1-Phase auf (Kap. 4.4.). Dagegen ist in WT-Zellen die Reparaturreffizienz der Zellen in beiden Zellzyklusphasen ähnlich (WT-MEFs, Kap. 4.3.3.) oder die G2-Zellen weisen eine etwa schlechtere Reparaturreffizienz als G1-Zellen auf (menschliche WT-Fibroblasten, Kap. 4.3.1. und 4.4.1.). Dies deutet darauf hin, dass die verbesserte Reparatur von NHEJ-defizienten Zellen in der G2-Phase auf die HR zurückzuführen ist. Aus den Reparaturstudien in NHEJ- und HR-Mutanten kann geschlussfolgert werden, dass das NHEJ die dominante Rolle in der G2-Phase und HR eher eine untergeordnete Funktion in der DSB-Reparatur übernimmt. Diese Annahme ist konsistent mit Überlebensstudien, die zeigten, dass NHEJ-defiziente Zellen über den gesamten Zellzyklus strahlenempfindlich waren, dennoch waren sie in der G2-Phase leicht strahlenresistenter als in der G1-Phase (Rothkamm et al., 2003).

Zusammengefasst konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass das NHEJ der Hauptreparaturweg strahleninduzierter DSBs sowohl in der G1- als auch der G2-Phase in menschlichen und murinen Zellen ist. Die dominante Rolle vom NHEJ in der G1- und G2-Phase wurde mittlerweile von einer anderen Arbeitsgruppe bestätigt (Mao et al., 2008). Diese Autoren transfizierten menschliche Zellen mit Vektoren, die GFP-basierende NHEJ- bzw. HR-Reporter sowie Erkennungssequenzen für die selten schneidende Endonuklease I-SceI enthielten. Nach der stabilen Integration des jeweiligen Vektors ins Chromosom wurden

5. Diskussion

die Zellen mit zwei Plasmide cotransfiziert, die jeweils für die I-SceI-Endonuklease und DsRed codieren. Die Expression der I-SceI-Endonuklease führt zur Induktion von DSBs, die durch NHEJ oder HR je nach Reporter behoben werden. Dies hat zur Folge, dass GFP exprimiert wird. Somit markierte jede GFP positive Zelle ein DSB-Reparaturereignis. Die Transfektion mit DsRed (Rote fluoreszierende Protein) diente als Nachweis für eine effiziente Zelltransfektion. Das Verhältnis von GFP positiven Zellen zu DsRed positiven Zellen stellt die Transfektionseffizienz des NHEJ bzw. der HR dar. Durch diese generierten NHEJ- und HR-Fluoreszenzreporter konnten diese Autoren HR- und NHEJ-Ereignisse quantitativ messen. Sie beobachteten die stärkste Aktivierung des NHEJ in der G2- und nicht der G1-Phase und die maximale Aktivierung der HR in der S-Phase nimmt in der G2-Phase, im Vergleich zur S-Phase wieder ab. Erstere konnte in dieser Arbeit nicht geschlussfolgert werden, da die Reparatureffizienz von NHEJ-Mutanten in der G2-Phase gleich oder leicht besser als in der G1-Phase war (Kap. 4.4.1. und 4.4.3.). Letztere konnte in dieser Arbeit nicht überprüft werden, da die DSB-Reparatureffizienz von S-Zellen nicht analysiert wurde, und damit konnte keinen Vergleich der Reparatureffizienz zwischen S- und G2-Zellen stattfinden. Die maximale Aktivierung der HR in der S-Phase ist durchaus vorstellbar, da die HR für die Reparatur von DNA-Schäden, die beim Arrest der Replikationsgabel entstehen, benötigt wird (Rothkamm et al., 2003; Saintigny et al., 2001; Arnaudeau et al., 2001). Bei diesem Prozess entstehen DSBs mit einem einzigen Bruchende, die unwahrscheinlich durch NHEJ beseitigt werden können. Interessanterweise dominiert das NHEJ selbst bei höchster HR-Aktivität in der S-Phase (Mao et al., 2008).

Wie im Kapitel 4.4.4. beschrieben, lässt sich die DSB-Reparaturkinetik von G1- und G2-Zellen durch eine schnelle und eine langsame Reparaturphase charakterisieren. Dies wurde auch in anderen Studien für G1-Zellen gezeigt (Löbrich et al., 1995; Wu et al., 2008). Innerhalb der ersten 4 h nach Bestrahlung wird die Mehrheit der DSBs in der G1- und G2-Phase beseitigt, denn zu diesem Zeitpunkt bleiben in NHEJ-Mutanten mehr als 50 % der DSBs unrepariert, wogegen HR-Mutanten einen ähnlichen Reparaturverlauf wie WT-Zellen zeigen (Kap. 4.4.4.). Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, dass NHEJ die schnelle Komponente der Reparatur ist. Dies wurde auch in anderen Studien beobachtet, die zeigten, dass die Mehrheit der DSBs in einem Intervall von 5–30 min (Hefferin et al., 2005; Lieber et al., 2004) bis 2 h (Rothkamm et al., 2003; Kühne et al., 2004) entfernt werden. In den weiteren 4 h nach Bestrahlung werden weitere 10–18 % der DSBs in der G1- und G2-Phase in WT-Zellen beseitigt (Kap. 4.4.4.). In diesem Zeitintervall verbleiben bis zu 15 % der DSBs in ATM-, Artemis-, MDC-1- und 53BP1-Mutanten unrepariert (Kap. 4.4.4.). Dies deutet darauf

5. Diskussion

hin, daß an der langsamen Reparaturphase in der G1-Phase die ATM-Epistaseproteine (ATM, Artemis, MDC-1 und 53BP1) involviert sind. Dies wurde bereits für diese Proteine mit Ausnahme von MDC-1 beschrieben (Riballo et al., 2004). In der G2-Phase dagegen wird die langsame Reparatur durch HR-Faktoren, darunter auch die ATM-Epistaseproteine, übernommen. Somit stellt die HR eine langsame Reparaturkomponente dar. Auch Mao et al, (2008) beobachteten, dass das NHEJ ein schnellerer Reparaturprozess als die HR in menschlichen Zellen ist.

Säugerzellen bevorzugen das NHEJ für die DSB-Reparatur (Iliakis et al., 2004). Eine Ausnahme stellen jedoch Hühner DT-40-Zellen dar, die durch Genkonversion zum größten Teil HR benutzen. (Sonoda et al., 2006). Dies mag daran liegen, dass diese Zellen über eine sehr kurze G1-Phase, im Gegensatz zu anderen Säugerzellen, verfügen und deshalb die Zahl der G1-Zellen sehr begrenzt ist (etwa 20 %). In anderen Säugern repräsentieren G1-Zellen mehr als die Hälfte der Zellpopulation und es ist durchaus vorstellbar, dass Hühner DT-40-Zellen die HR als Hauptalternative aussuchen. Aufgrund ihrer erhöhten HR-Rate sind sie für *Gene-Targeting*-Experimente besonders gut geeignet (Sonoda et al., 2001). Warum fast alle Säugerzellen das NHEJ trotz der fehlerhaften Reparatur gegenüber der HR bevorzugen, könnte an unterschiedlichen Gründen liegen. Zum einen sind die an NHEJ beteiligten Proteine weniger zahlreich und der Reparaturmechanismus ist weniger komplex. Außerdem kann die fehlerhafte Reparatur toleriert werden, da nur ein kleiner Teil des Genoms über codierende Bereiche verfügt. Somit bleiben Deletionen oder Insertionen, verursacht durch NHEJ, in nicht codierenden Bereichen meist ohne große Konsequenzen für den Organismus. Die HR dagegen benötigt Energie in Form von ATP für die Bildung und die Stabilisierung des Rad51-Nukleoproteinfilaments und für die Stranginvasion. Im Gegensatz zu NHEJ sind zahlreiche Proteine an der HR beteiligt, deren Funktionen bisher noch nicht vollständig geklärt worden sind. Außerdem führt eine fehlerhafte Rekombination zu der Karzinogenese und der Zellalterung (Lieber et al., 2004). Aus diesen Gründen stellt das NHEJ für Säugerzellen eine sichere Alternative zur Vorbeugung von genomischen Rearrangements dar.

5.3.2. Vergleich des Ausmaßes der Reparaturdefekte unterschiedlicher NHEJ- und HR-Mutanten

5.3.2.1. Vergleich des Ausmaßes der Reparaturdefekte von Ku80-, DNA-PKcs- und Ligase4-defizienten MEFs

In dieser Arbeit wurde die DSB-Reparatur von Zellen, die für klassische NHEJ-Proteine wie Ku80, DNA-PKcs und Ligase4 mutiert sind, analysiert. Diese Zellen weisen einen starken

5. Diskussion

Reparaturdefekt, der charakteristisch für klassische NHEJ-Mutanten ist, auf (Abb. 4.16). Dennoch war dieser Reparaturdefekt in NHEJ-defizienten MEFs unterschiedlich stark ausgeprägt. Die Ku80-Mutante zeigt im Vergleich zu der DNA-PKcs-Mutante einen stärkeren Reparaturdefekt (Abb. 4.16.). Dies deutet darauf hin, dass Ku80 eine wichtigere Funktion als DNA-PKcs übernehmen könnte. Dies mag erstaunlich sein, da DNA-PKcs zusammen mit Ku70 und Ku80 den DNA-PK-Komplex bilden. Dadurch wäre durchaus vorstellbar einen ähnlichen Reparaturdefekt in beiden Mutanten zu beobachten. Das bessere Reparaturverhalten der DNA-PKcs-Mutante könnte daran liegen, dass DNA-PKcs zwar eine Kernkomponente des NHEJ ist, aber für die direkte Reparatur von strahleninduzierten DSBs nicht zwingend erforderlich ist (Smith und Jackson, 1999). Es wird vermutet, dass DNA-PKcs die DSB-Reparatur durch Phosphorylierung und Stimulation weiterer Faktoren, die an die Bruchenden rekrutiert werden, lediglich erleichtert (Kurimasa et al., 1999). Durch Autophosphorylierung aktiviertes DNA-PKcs rekrutiert das Ligase4/XRCC4-Komplex an die Bruchenden. In der Abwesenheit von DNA-PKcs sollte auch die stattfinden können. Tatsächlich wurde veröffentlicht, dass Ku das Ligase4/XRCC4-Komplex direkt zu den Bruchenden rekrutieren kann (Nick McElhinny et al., 2000). Dies lässt vermuten, dass DNA-PKcs zwar für das NHEJ wichtig ist, aber in seiner Abwesenheit die DSB-Reparatur langsamer ablaufen kann.

Der Ku80-Reparaturdefekt war auch stärker als derjenige von Ligase4 (Abb. 4.16.). Dadurch wird vermutet, dass Ku80 eine wichtigere Rolle als Ligase4 im NHEJ übernimmt. Diese Hypothese ist durchaus vertretbar, falls betrachtet wird, dass Ku für seine hohe Bindungsaffinität an DSB-Enden bekannt ist und diese erfordert keine Beteiligung von anderen NHEJ-Proteinen (Yano et al., 2009). In der Abwesenheit von Ku wird das NHEJ unterbunden, dann Ku scheint unersetzbar zu sein. Im Widerspruch dazu sind Ku80 in Gegensatz zu Ligase4-*Knockout* Mäuse lebensfähig (Pierce et al., 2001; Van Gent et al., 2001). Dies stellt ein Widerspruch zu der Annahme, dass Ku80 wichtiger als Ligase4 sei. Auch biochemische Studien konnten zeigen, dass die Ligationsaktivität der Ligase4 in Abwesenheit von Ku möglich ist (Gu et al., 2007). In dieser Studie wurden Doppelsträngige Oligonukleotide, die eine Lückenstelle für einen Nukleotid auf dem einen DNA-Strang enthielten, synthetisiert. Die Lückenstelle wurde radioaktiv markiert und die Oligonukleotide wurden mit dem Ligase4/XRCC4-Komplex und mit bzw. ohne Ku inkubiert. Anschließend wurden die Oligonukleotide sequenziert. Es wurde beobachtet, dass der Ligase4/XRCC4-Ligationskomplex in der Abwesenheit von Ku fähig war, die DNA-Strangenden trotz der Nukleotidlücke miteinander zu ligieren. Die Anwesenheit von Ku stimuliert hauptsächlich den Ligationsschritt. Die DSB-Erkennung durch Ku und die Ligation der Bruchenden durch

5. Diskussion

das Ligase4/XRCC4-Komplex sind wichtige NHEJ-Prozesse und somit sind Ku80 oder Ligase4 unverzichtbar. Eine mögliche Erklärung für den etwa stärkeren Ku80-Reparaturdefekt gegenüber demjenigen der Ligase4-Mutante könnte daran liegen, dass andere Ligasen in der Abwesenheit von Ligase4 einen minimalen Anteil an DSBs ligieren können. Mögliche Kandidaten sind Ligase1 oder Ligase3. Untersuchungen der V(D)J-Rekombination, die das NHEJ für die Entfernung der bei der Antikörperherstellung generierten DSBs verwendet, zeigten, dass die Ligation der DSB-Enden in der Abwesenheit von Ligase4 durch Ligase1 und Ligase3 erfolgen kann (Corneo et al., 2007). Weiterhin konnte in Ligase4-defizienten MEFs gezeigt werden, dass ein minimaler Anteil an strahleninduzierten DSBs beseitigt wurde. Dies wird jedoch bei der Depletion von Ligase3 mittels siRNA bis zu 80 % vermindert (Wang et al., 2005). Diese Beobachtungen lassen hindeuten, dass ein sehr kleiner Anteil der DSB-Enden in der untersuchten Ligase4-defizienten MEFs (Abb. 4.16.) durch Ligase1 oder Ligase3 ligiert werden können und deswegen könnte der Ligase4-Reparaturdefekt etwas schwächer verglichen mit dem Ku80-Reparaturdefekt sein.

Zusammengefasst weist die Ku80-Mutante den stärksten Reparaturdefekt gegenüber der Ligase4- und DNA-PKcs-Mutante. Dies mag daran liegen, dass Ku als NHEJ-Sensor wirkt. Erst durch die Ku-Bindung an den Bruchenden wird NHEJ initiiert. DNA-PKcs, obwohl ein wichtiger NHEJ-Faktor, scheint eher diesen Prozess zu stimulieren, sodass in seiner Abwesenheit NHEJ vermindert aber nicht verhindert wird. Dadurch weist die DNA-PKcs-Mutante eine bessere DSB-Reparatur gegenüber den anderen NHEJ-Mutanten auf. Defizienz in der Ligase4 kann minimal durch Ligase1 oder Ligase3 kompensiert werden. Dies mag daran erklären, warum die Ligase4-Mutante eine leicht verbesserte DSB-Reparatur gegenüber der Ku80-Mutante aufweist.

5.3.2.2. Vergleich des Ausmaßes der Reparaturdefekte von XRCC2- und Rad54-defizienten MEFs

Ähnlich wie bei NHEJ-Mutanten gibt es Unterschieden in Ausmaß des Reparaturdefekts der in dieser Arbeit untersuchten HR-Mutanten. Rad54- und XRCC2-Mutanten zeigen in der G2-Phase einen kleinen Reparaturdefekt (Abb. 4.11.B). Jedoch war der Reparaturdefekt der Rad54-Mutante etwas ausgeprägter als derjenige einer XRCC2-Mutante (Abb. 4.11.B). Dies könnte darauf hindeuten, dass Rad54 eine wichtigere Rolle als XRCC2 in der HR übernimmt. Der Unterschied im Reparaturverhalten beider HR-Mutanten könnte womöglich mit derer Funktion in der HR korrelieren. XRCC2 ist ein Paraloge von Rad51, das die zentrale Rolle in der HR übernimmt. Die HR wird durch die Bindung von Rad51 an den RPA-besetzten DNA-Enden, gefolgt von der Bildung des Rad51-Nukleoproteinfilaments initiiert. Danach erfolgt

5. Diskussion

ein Strangaustausch zwischen dem Rad51-Nukleoproteinfilament und der unbeschädigten DNA-Matrix. Dieser Schritt wird jedoch ineffizient durch Rad51, im Gegensatz zu seinem bakteriellen Homologe RecA, reguliert (Roca und Cox, 1997). Dies hat zur Folge, dass die Strangaustauschaktivität deutlich vermindert wird (Baumann et al., 1996; Gupta et al., 1997). Diese Rekombinaseaktivität von Rad51 kann durch XRCC2 deutlich unterstützt werden (Shim et al., 2004). Diese Beobachtungen zeigen, dass XRCC2 an der HR-Initiation beteiligt sein sollte. Rad51 bildet nukleare Foci als Antwort auf einen DSB in der Zelle. Es wurde gezeigt, dass in Abwesenheit von XRCC2, die Rad51-Focibildung nur sehr langsam und verzögert erfolgt (Liu et al., 2002). Dies deutet darauf hin, dass XRCC2 für die schnelle Rad51-Focibildung und damit die HR-Initiation essentiell ist. Ist diese einmal erfolgt, kann die HR auch ohne XRCC2 fortgesetzt werden. In der XRCC2-Abwesenheit sollte dennoch die HR, wenn auch verlangsamt, stattfinden können. Außerdem konnte bisher keine direkte Interaktion zwischen Rad51 und XRCC2, im Gegensatz zu XRCC3, ein anderer Rad51-Paraloge, nachgewiesen werden (Liu et al., 1998; Liu et al., 2002). All diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass XRCC2 keine Hauptkomponente der HR ist. Dies mag erklären, warum der XRCC2-Reparaturdefekt relativ klein ist (Abb. 4.11.).

Im Gegensatz zu XRCC2 ist Rad54 an allen HR-Schritte beteiligt. Rad54 und Rad52 stimulieren die Entfernung des gebundenen RPA an den einzelsträngigen DSB-Enden und die anschließende Bindung von Rad51 an diesen Enden (Wolner et al., 2003; Sung et al., 2003). Weiterhin bildet Rad54 mit dem Rad51-Nukleoproteinfilament einen Co-Komplex, der die Stabilisierung des Nukleoproteinfilaments ermöglicht (Mazin et al., 2003). Zahlreiche Studien haben eine physikalische Interaktion zwischen Rad54 und Rad51 bereits beschrieben (Tan et al., 1999; Clever et al., 1997; Golub et al., 1997). Diese Beobachtungen zeigen, dass Rad54 an der HR-initiation, der erste HR-Schritt beteiligt ist. Nach der HR-Initiation invadiert das Rad51-Nukleoproteinfilament auf der Suche nach Homologien auf der unbeschädigten DNA-Matrize mit anschließender Bildung von Hollidays-Junctions. Dieser zweite Schritt der HR wird durch die Rad52-Epistasigruppe, zu der auch Rad54 gehört, stimuliert (Solinger et al., 2001). Rad54 als Topoisomerase induziert negative Superspiralisierung in der DNA-Matrize, was die Basenpaarung innerhalb der DNA-Matrize negativ beeinflusst. Dadurch könnte der Strangaustausch zwischen dem Rad51-Nukleoproteinfilament und der DNA-Matrize erleichtert werden (zusammengefasst in Heyer et al., 2006). Dies zeigt, dass Rad54 auch an diesen zweiten Schritt der HR beteiligt ist. Der dritte und letzte Schritt der HR ist die Branchmigration, die Auflösung von Hollidays-Junctions gefolgt von der DNA-Synthese- und Ligation. Für Rad54 ist eine Funktion bei der Erhöhung der Geschwindigkeit der

5. Diskussion

Strangmigration während des Strangaustauschs beschrieben (Solinger et al., 2001). Auch nach dem Strangaustausch ist Rad51 an dem Heteroduplex-DNA-Produkt gebunden und dissoziiert anschließend von diesen, um den Zugriff von Polymerasen zu erlauben. Allerdings läuft diesen Prozess bei Rad51, im Gegensatz zu seinem bakteriellen Homologe RecA, sehr langsam ab (Bianco et al., 1998). Studien lassen vermuten, dass Rad51 von Rad54 in diesem Prozess unterstützt wird, da Rad54 die Dissoziation von Rad51 von der doppelsträngigen Heteroduplex-DNA befördert (Solinger et al., 2002). Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass Rad54 auch an dem dritten und letzten Schritt der HR beteiligt ist. Die Teilnahme von Rad54 an allen Schritten der HR, seine Interaktion mit Rad51 und seine unterstützende Rolle in der Rad51-Aktivität führen zu der Annahme, dass Rad54 eine Hauptkomponente der HR ist. Dies mag erklären, warum die Rad54-Mutante einen höheren Reparaturdefekt als andere HR-Mutante in der G2-Phase aufweist (Abb. 4.11.B).

Zusammengefasst ist der Reparaturdefekt der Rad54-Mutante stärker ausgeprägt im Vergleich zu demjenigen der XRCC2-Mutante. Dies mag daran liegen, dass Rad54, im Gegensatz zu XRCC2, an allen wichtigen Schritten der HR beteiligt ist.

5.3.3. Analyse des unterschiedlichen Reparaturverhaltens in NHEJ/HR-defizienten Zellen

Im Kap. 4.5. wurde die DSB-Reparatur von verschiedenen NHEJ/HR-defizienten Zellen untersucht. Ziel der Experimente war die Auswirkung auf der DSB-Reparatur von Zellen, in denen beide Hauptreparaturwege, insbesondere in der G2-Phase, unterdrückt wurden, zu analysieren. Es wird im Allgemeinen angenommen, dass NHEJ und HR zwei unterschiedliche Reparaturmechanismen in der G2-Phase sind. Daher sollte die simultane Unterdrückung beider Mechanismen zu einem resultierenden NHEJ/HR-Reparaturdefekt in den betroffenen Zellen führen. Dies trifft bei Rad54/DNA-PKcs-defizienten Zellen zu (Abb. 4.19.), in denen der resultierende Reparaturdefekt sich aus den einzelnen Rad54- und DNA-PKcs-Reparaturdefekten zusammenaddiert. Dies ist konsistent mit der Erhöhung der Strahlenempfindlichkeit, die in Rad54/Scid-defizienten Zellen im Vergleich zu Rad54- und Scid-defizienten Zellen beobachtet wurde (Essers et al., 2000). Scid-Mäuse sind End-Joining defekt. Im Gegensatz dazu konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass Ku80/Rad51- und Ligase4/Rad54-defizienten Zellen keinen additiven Reparaturdefekt im Vergleich zu den jeweiligen einzelnen Mutanten aufweisen (Abb. 4.17., 4.18.). Ku80/Rad51- bzw. Ligase4/Rad54-defiziente Zellen zeigen ein beinahe ähnliches Reparaturverhalten wie Ku80- bzw. Ligase4-defiziente Zellen. Diese Beobachtung ist unerwartet, denn sie bedeutet, dass die

5. Diskussion

Inhibierung der HR in diesen Doppelmutanten keine Auswirkung zu haben scheint. Eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanz in den untersuchten Doppelmutanten könnte die Tatsache sein, dass der Ku80- und Ligase4-Reparaturdefekt so stark ist, dass es den kleinen HR-Reparaturdefekt in den betroffenen Doppelmutanten unterdrückt. Dies ist bei der Ligase4/Rad54-Doppelmutante am besten zu sehen, da diese eine verschlechtere Reparaturreffizienz (32 %, Kap. 4.5.2.) gegenüber der Ligase4-Mutante (38 %, Kap. 4.5.2.) in der G2-Phase aufweist. Dies bedeutet, dass die um 6 % verschlechterte Reparaturreffizienz der Ligase4/Rad54-Doppelmutante gegenüber der Ligase4-Mutante auf die Anwesenheit von Rad54 zurückzuführen ist. Dennoch ist dieser Effekt deutlich schwächer als der Rad54-Reparaturdefekt (19 %, Kap. 4.5.2.). Dagegen ist der DNA-PKcs-Reparaturdefekt deutlich schwächer als derjenige von Ligase4 und Ku80 (Abb. 4.16.). Studien in unserem Labor haben gezeigt, dass DNA-PKcs-inhibierte Zellen nach längeren Reparaturzeiten beinahe das Niveau von WT-Zellen in der G2-Phase erreichen (Beucher et al., 2009). Dies ist nicht der Fall in NHEJ-defizienten Zellen (Dr. Nicole Denzer, persönliche Mitteilung). Aus diesen Beobachtungen kann angenommen werden, dass der DNA-PKcs-Reparaturdefekt nicht stark genug ist, um den kleinen HR-Reparaturdefekt in der betroffenen Doppelmutante verdrängen zu können. Gegen diese Vermutung spricht jedoch das Ergebnis der ATM inhibierten Ligase4-Mutante, denn hier konnte in dieser Arbeit eine Erhöhung des Reparaturdefekts in der G2-Phase gezeigt werden (Abb. 4.21.B). Diese Erhöhung korreliert mit dem Reparaturdefekt von ATM-defizienten Zellen (Kap. 4.5.4.2.). Da ATM eine HR-Komponente in der G2-Phase ist (Kap. 4.3.5., Beucher et al., 2009), ist dieses Ergebnis erwartungsgemäß. Allerdings zeigen ATM- und Rad54-defiziente Zellen einen ähnlichen Reparaturdefekt in der G2-Phase und sind epistatisch zueinander (Kap. 4.3.5.2.), daher stellt sich die Frage warum die Inhibition von ATM und nicht die von Rad54 eine Auswirkung im Reparaturverhalten der Ligase4-Mutante hat. Denn ATM ist, im Gegensatz zu Rad54 keine klassische HR-Komponente, da ATM-defiziente Zellen, im Gegensatz zu Rad54-defizienten Zellen auch einen Reparaturdefekt in der G1-Phase aufweisen (Abb. 4.11.A). In jüngster Zeit wurde publiziert, dass die Reparatur von DSBs, die innerhalb oder in der Nähe des Heterochromatins lokalisiert sind, ATM benötigt (Goodarzi et al., 2008; Goodarzi et al., 2009). Dadurch konnte vermutet werden, dass eine Minderheit der strahleninduzierten DSBs in der Ligase4-Mutante innerhalb des Heterochromatins entsteht, und solche DSBs benötigen ATM, nicht aber Rad54 für deren Reparatur. Da ATM und Rad54 jedoch in der G2-Phase epistatisch zueinander sind, kann vermutet werden, dass andere DSBs, die möglicherweise ausserhalb des Chromatins entstehen, ATM und Rad54 für deren Reparatur benötigen.

5. Diskussion

5.3.4. Sind außer NHEJ und HR andere Reparaturmechanismen an der DSB-Reparatur beteiligt?

Obwohl von der Literatur im Allgemeinen angenommen wird, dass NHEJ und HR für die Reparatur von DSBs zuständig sind, können jedoch andere Reparaturmechanismen an diesen Prozess beteiligt werden. Wie im Kap. 4.4. beschrieben, können alle untersuchten NHEJ-Mutanten einen sehr kleinen Anteil an DSBs in der G1-Phase beseitigen, obwohl der Hauptreparaturmechanismus defekt ist. Dies deutet darauf, dass neben NHEJ andere Reparaturmechanismen, HR ausgeschlossen, an der DSB-Reparatur in der G1-Phase beteiligt sein könnten. Mögliche Kandidaten, die eine Rolle in einem alternativen Reparaturmechanismus in der G1-Phase übernehmen können, sind PARP-1, XRCC1, Ligase3 und Histon H1. Sie werden von einigen Forschungsgruppen dem backup-NHEJ zugeordnet (Wang et al., 2003; Liang et al., 2005; Wang et al., 2006; Wang et al., 2005). Die Depletion von Ligase3 in Ligase4-defizienten murinen Fibroblasten reduziert deren schon niedrige Reparaturreffizienz um bis zu 80 % (Wang et al., 2005). PARP-1 konkurriert mit Ku an den DSB-Enden und reguliert in der Abwesenheit von Ku das Endjoining (Wang et al., 2006). In der Abwesenheit von klassischen NHEJ-Faktoren kann H1 an den Bruchenden anstelle von Ku binden. Dadurch wird der Ligase3/XRCC3-Ligationskomplex an dem Bruch rekrutiert. Dieser Prozess wird vermutlich durch PARP-1 unterstützt. Allerdings ist dieser Reparaturmechanismus als sehr langsam beschrieben (Perrault et al., 2004; Rosidi et al., 2008). Dieser Backup-Pathway ist unabhängig von DNA-PK und wird ebenfalls unabhängig von Rad52-Epistasisproteine aktiviert (DiBiase et al., 2000; Wang et al., 2001). Eine mögliche HR kann somit ausgeschlossen werden. Diese Beobachtungen deuten darauf, dass der stark Reparaturdefekt von klassischen NHEJ-Mutanten minimal durch diesen Backup-Reparaturmechanismus kompensiert wird.

Auch NHEJ/HR-Doppelmutanten können trotz Inhibition beider Reparaturwege in der G2-Phase einen kleinen Anteil an DSBs dennoch beseitigen (Kap. 4.5.). Dies deutet darauf hin, dass andere zusätzliche Reparaturfaktoren für diese DSBs benötigt werden. Eine mögliche Erklärung ist, dass simultane Defizienzen in NHEJ und HR zur Aktivierung des Backup-Reparaturwegs führen können. Eine andere Erklärung ist, dass ein minimaler Anteil an DSBs in Doppelmutanten durch andere Reparaturmechanismen beseitigt wird, die primär an der DSB-Reparatur nicht beteiligt sind. Es wurde publiziert, dass Proteine, die eine Funktion in der Nukleotidexzisions (NER)- und Mismatch (MMR)-Reparatur übernehmen, auch an der DSB-Reparatur beteiligt sind (zusammengefasst in Zhang et al., 2009). Die NER repariert DNA-Schäden, die durch Cisplatin oder UV verursacht werden (Boers und Hoeijmakers,

5. Diskussion

2000). Dabei werden Basen wie z.B. Adenin oder Guanin methyliert, sodass deren Paarungseigenschaften verändert werden und es deshalb zu Transitionen kommt. Die NER ist ein komplexer Prozess, an dem mehr als 20 Proteine beteiligt werden (Wood et al., 2001). Dabei übernehmen die XP-Proteine (XPA – G) die führende Funktion. Erste Hinweise auf einem Zusammenhang zwischen NER-Faktoren und der DSB-Reparatur ergaben sich aus Untersuchungen, in denen gezeigt werden konnte, dass die langzeitige Unterdrückung von XPC in HeLa-Zellen einen Einfluss auf die NHEJ-Reparatureffizienz hat, obwohl die Expression der NHEJ-Proteine nicht verändert wird (Despras et al., 2007). Die NHEJ-Reparatureffizienz wird in XPC-depletierten Zellen um 30 – 40 % reduziert. XPC ist an dem Schadenserkennungsprozess beteiligt und bindet durch seine hohe Bindungsaffinität für DNA an der Schadensstelle (Volker et al., 2001; Reardon et al., 1996). Außerdem konnte für XPC-defiziente Zellen eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber dem Topoisomerase II-Inhibitor Etoposid nachgewiesen werden (Despras et al., 2007). Etoposid generiert während der Replikation DSBs. Die Herunterregulation von XPA, im Gegensatz zu der von XPC, hat keinen Einfluss auf die NHEJ-Reparatureffizienz (Despras et al., 2007). Dies deutet darauf hin, dass XPC nicht aber alle NER-Faktoren bei der DSB-Reparatur interagieren können. Aus diesen Beobachtungen könnte ein Modell geschlossen werden, indem in der NHEJ/HR-Abwesenheit XPC an den Bruchenden bindet und die DSB-Reparatur durch unbekannte mitwirkende Faktoren einleitet. Dennoch wurde dadurch nur ein sehr minimaler Anteil an DSBs beseitigt, womöglich nicht fehlerfrei, da im Gegensatz zum klassischen NER-Reparaturmechanismus kein unbeschädigter DNA-Strang als Matrize dienen kann.

Auch für Proteine eines weiteren Reparaturmechanismus, dem MMR (Mismatchreparatur) könnte eine Beteiligung an der DSB-Reparatur beschrieben werden (Zhang et al., 2009). Das MMR-System ist für die postreplikative Reparatur von Mismatches (Fehlpaarungen) verantwortlich. Zwei verschiedene Heterodimere-Komplexe MSH2/MSH3 und MSH2/MSH6 binden an die DNA und erkennen mit unterschiedlicher Spezifität Fehlpaarungen. Es wurde beschrieben, dass MSH2 und MSH3 in der Hefe *Saccharomyces Cerevisiae* an der HR über Genkonversion und an der SSA beteiligt sind. Sie sind neben der Endonuklease Rad1/Rad10 für die Entfernung der nicht homologen Bereiche an den DNA-Enden vor der Ligation zuständig (Sugawara et al., 1997; Sugawara et al., 2000). So beeinträchtigt Defizienzen in MSH2 und MSH3 die HR-Effizienz durch Bestehen von nicht homologen DNA-Bereiche an den Bruchenden (Surtees et al., 2006). In MSH2-defizienten Zellen konnte ebenfalls eine Verzögerung der Abbildung der Rad51-Foci beobachtet werden (Pichierri et al., 2001). MSH2-defiziente Zellen, die mit Röntgenstrahlung bestrahlt wurden, zeigen keine

5. Diskussion

Relokalisierung von Mre11 und Rad51 und auch ein reduziertes Zellüberleben, die mit gesteigerten chromosomalen Schäden in G2-Zellen assoziiert sind (Franchitto et al., 2003). Diese Untersuchungen deuten darauf hin, dass MSH2 womöglich die HR unterstützt, aber nicht ersetzt. Somit ist es kaum wahrscheinlich, dass der kleine Anteil an reparierten DSBs in den NHEJ/HR-Doppelmutanten (Kap. 4.5.) auf die Wirkung von MSH-Proteinen zurückzuführen ist.

Zusammengefasst sind NHEJ/HR-defiziente Zellen fähig, trotz der Abwesenheit beider Hauptreparaturwege, einen minimalen Anteil an DSBs zu beseitigen. Möglicherweise wird dieser Anteil durch andere Mechanismen repariert. Eine gute Möglichkeit wäre die Aktivierung der Backup-Pathway des NHEJ in den Doppelmutanten. Einige Studien zeigen, dass NER- und MMR-Reparaturproteine auch an der DSB-Reparatur beteiligt sein könnten. Diese Proteine scheinen aber eher das NHEJ bzw. die HR zu unterstützen und nicht zu ersetzen.

5.3.5. Die Selektion des DSB-Reparaturwegs

Eine der wichtigsten Fragen bei der Untersuchung der DSB-Reparatur ist der molekulare Mechanismus, der für die zellzyklus-abhängigen Auswahl des Reparaturwegs entscheidend ist (Shrivastav et al., 2008; Sonoda et al., 2006; Branzei und Foiani, 2008). Die HR-Proteine Rad51 und Rad52 und NHEJ-Proteine Ku und DNA-PKcs besitzen eine Bindungsaffinität für die Bruchenden (Baumann und West, 1998; Haber, 2000). Es ist denkbar, dass die Auswahl des Reparaturwegs von den Proteinen, die als erste an den DSB-Enden binden, abhängig ist. Für Ku wurde nachgewiesen, dass es eine sehr hohe Bindungsaffinität für DSB-Enden hat und in zahlreicher Menge im Kern vorhanden ist (Mimori et al., 1986; Blier et al., 1993). Somit kann vermutet werden, dass Ku unter Umstände immer als erstes an die Bruchenden bindet. So beschrieb Kim et al., (2005), dass die Rekrutierung von Ku zu den Bruchenden vor derjenigen von Rad51 erfolgt. Auch in anderen Studien mit Live Zellmikroskopie konnte bisher keine Zellzyklus-abhängige Assemblierung von klassischen NHEJ-Faktoren nachgewiesen werden, da diese Faktoren ebenfalls in der S- und G2-Phase beobachtet werden konnten (Yano et al., 2009). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass beim Auftreten eines DSBs die Rekrutierung der NHEJ-Faktoren immer diejenige von HR-Faktoren vorausgehen sollte. Dies ist im Einklang mit den Ergebnissen in dieser Arbeit, die zeigen, dass NHEJ ein schneller und HR ein langsamer Reparaturprozess ist (Kap. 4.4.4.). Die schnellere Rekrutierung von Ku zu den Bruchenden lässt vermuten, dass Ku durch die Konkurrenz mit anderen HR-Faktoren die Wahl des Reparaturwegs in der Zelle für das NHEJ

5. Diskussion

positiv beeinflusst. Wenn dies der Fall ist, sollte in der Abwesenheit von Ku die Effizienz der HR zunehmen und die Deletion eines weiteren NHEJ-Faktors keinen Einfluss auf die HR-Effizienz haben. Ergebnisse der vorliegenden Arbeit liefern Anzeichen für die Richtigkeit der Vermutung. So zeigt eine Ku80-Mutante in der G2-Phase einen starken Reparaturdefekt (Abb. 4.16.B), dennoch ist ihre Reparaturreffizienz mit 30 % in der G2-Phase besser als mit 23 % in der G1-Phase (Kap. 4.4.3.). Im Vergleich weist die Ligase4-Mutante mit einer Reparaturreffizienz von 36 % in der G1- und 38 % in der G2-Phase kaum einen Unterschied auf. Die bessere Reparaturreffizienz einer Ku80-Mutante in der G2-Phase könnte durch eine erhöhte HR-Effizienz erklärt werden, wogegen in der Ligase4-Mutante die HR-Reparatur weiterhin durch Ku80 verhindert wird. Andere Studien belegen diese Ergebnisse. Es wurde gezeigt, dass Ku80-defiziente DT-40-Zellen in der G2-Phase strahlenresistent sind, gleichzeitig zeigen sie eine erhöhte HR-Effizienz für die I-SceI-induzierte DSBs (Adachi et al., 2001). Dagegen weisen Ligase4- und DNA-PKcs-defiziente DT-40-Zellen keine Erhöhung der HR-Effizienz und keine Strahlenresistenz in der G2-Phase auf (Adachi et al., 2001). Ähnlich konkurrierten Ku80 und HR in Hamster CHO-Zellen (Mansour et al., 2008). In dieser Studie zeigten die Autoren, dass Ku80 die Genkonversion, ein Mechanismus der HR, unterdrückt. Die Autoren transfizierten WT- und Ku80-defiziente CHO-Zellen mit einem Plasmid, das ein Substrat für GC (Genkonversion), eine Erkennungssequenz für die I-SceI-Endonuklease und eine GFP-kodierende Sequenz enthielt. Durch die Expression der I-SceI-Endonuklease wird ein DSB induziert, der auch durch Genkonversion behoben werden kann. Eine stattgefunden DSB-Reparatur bewirkt auch die Expression des vorher inaktivierten GFP-Proteins im Plasmidkonstrukt und der Anteil an GFP-positiven Zellen wird als Maß für DSB-Reparaturereignisse ausgewertet. Der Anteil an GFP-positiven Zellen war 6-fach höher in Ku80-defizienten Zellen gegenüber Kontrollzellen. Dieser erhöhte GC-Reparaturanteil in Ku80-defizienten Zellen war jedoch stark minimiert, wenn vorher Rad51 in diesen Zellen herunterreguliert wird (Mansour et al., 2008). Dies zeigt, dass Ku80 die Rad51-vermittelte Genkonversion unterdrückt. Alle diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass Defizienzen in Ku die HR-Effizienz erhöhen. Demgegenüber stehen Studien, die dieser Schlussfolgerung widersprechen. So wurde publiziert, dass die Unterdrückung von Ku80 in Säugerzellen zwar die NHEJ-Effizienz für I-SceI-induzierte DSBs vermindert, aber die HR-Rate nicht erhöht (Takashima et al., 2009). In *in vivo* Studien führte die Defizienz in Ku80 in murinen Zellen sogar zur Reduktion der HR-Frequenz (Reliene et al., 2004). Trotz dieser widersprüchlichen Befunde ist es durchaus vorstellbar, dass Ku durch seine Bindung an die Bruchenden die

5. Diskussion

Resektion von diesen durch Nukleasen wie Mre11/CtIP blockiert und dadurch die HR verhindert.

Neben dem Ku-Protein werden in der Literatur andere Faktoren beschrieben, die die Wahl des Reparaturwegs beeinflussen können, darunter PARP [Poly(ADP Ribose)Polymerase-1] und Rad18. Poly (ADP Ribosyl)ierung ist eine rasche posttranslationelle Modifikation von Histonen und anderen nukleären Proteine, die an das Zellüberleben nach Eintritt eines DNA-Schadens beteiligt sind (Ame et al., 2004). PARP-1 und PARP-2 sind die beiden Mitglieder der PARP-Familie, deren katalytische Aktivität durch DNA-Strangbrüche stimuliert wird (Ame et al., 2004). PARP-1 ist für die Wahl des Reparaturwegs entscheidend, indem es das NHEJ durch eine physikalische Wechselwirkung mit Ku unterdrückt (Hohegger et al., 2006). In dieser Studie zeigten die Autoren, dass PARP-1-defiziente DT-40-Hühnerzellen eine um weniger als die Hälfte reduzierte HR-Effizienz für I-SceI-induzierte DSBs im Vergleich zu WT-Zellen aufweisen. PARP-1/Ku70-defiziente DT-40-Zellen wiesen dagegen eine höhere HR-Effizienz als WT-Zellen auf, die vergleichbar zu der von Ku70-defizienten Zellen war. Die transiente Expression von Ku70 in PARP-1- bzw. PARP-1/Ku70-defizienten DT-40-Zellen vermindert die HR-Effizienz dieser Zellen um 3- bzw. 4-fach. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Abwesenheit von PARP-1 die HR negativ beeinflusst. Dieser negative Einfluss kann allerdings durch die zusätzliche Inhibierung von Ku70 aufgehoben werden, da Ku die HR inhibiert. Ku wird *in vitro* durch PARP-1 poly (ADP-ribosyl)iert. Diese Modifikation verhindert die Bindung von Ku an die DNA-Enden (Li et al., 2004). Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass PARP die Wahl des Reparaturwegs zur Begünstigung der HR reguliert. Tatsächlich zeigen PARP-1-defiziente DT-40-Zellen eine reduzierte HR, die auf einer Hypersensitivität zu Camptothecin (CPT) zurückzuführen ist (Saber et al., 2007; Hohegger et al., 2006). CPT ist eine Topoisomerase I-Inhibitor. Topoisomerase katalysieren die koordinierte Spaltung und Wiederversiegelung der DNA-Schäden während der Replikation. Dabei schneidet die Topoisomerase I einen Strang und bindet an diesen. Nach dem Abgang von der Topoisomerase I aus der DNA wird der Strang wieder verschlossen (Peter Karlson: Karlsons Biochemie und Pathobiochemie, 2005). Der Topoisomerase I-DNA-Komplex wird durch CPT immobilisiert, sodass keine Wiederverschließung des DNA-Strangs erfolgen kann. Dies hat zur Folge, dass die Replikation unterbrochen wird und DSBs auf einem Schwesterchromatid entstehen (Pommier et al., 2003; Saleh-Gohari et al., 2005). Solche DSBs werden bevorzugt durch HR beseitigt (Saleh-Gohari et al., 2005). Somit werden HR- und nicht NHEJ-defiziente Zellen empfindlich zu CPT (Connelly und Leach, 2004). Ku70-defiziente Zellen sind sogar resistenter als WT-Zellen zu CPT (Adachi et al., 2004;

5. Diskussion

Hochegger et al., 2006). Die Deletion von Ku70 in PARP-1-defizienten DT-40-Zellen stellt eine zu WT-Zellen ähnliche Resistenz zu CPT in PARP-1-defizienten Zellen wieder. Diese Beobachtungen verstärken die Annahme, dass Ku die HR vermindert und PARP-1 die HR positiv beeinflusst. Ähnliche Ergebnisse wurden auch in menschlichen Zellen erzielt, in denen PARP durch Anwendung von PARP-Inhibitoren unterdrückt wurde (zusammengefasst in Sonoda et al., 2006). Rad18 scheint, ähnlich wie PARP-1, die HR zu begünstigen. Tatsächlich weisen Rad18-defiziente DT-40-Zellen eine reduzierte HR-Effizienz für I-SceI-induzierte DSBs und eine Hypersensitivität zu CPT im Vergleich zu WT-Zellen (Saber et al., 2007). Wie für PARP-1 bewirkt die Unterdrückung des NHEJ in Rad18-defizienten DT-40-Zellen eine Erhöhung der HR-Effizienz für I-SceI-induzierte DSBs, ähnlich zu der von WT-Zellen sowie eine Wiederherstellung der Resistenz zu CPT (Saber et al., 2007). Doppelte Defizienzen in PARP-1 und Rad18 erhöhen die CPT-Hypersensitivität verglichen zu den einzelnen Defizienzen (Saber et al., 2007). Dies deutet darauf hin, dass PARP-1 und Rad18 unabhängig voneinander das NHEJ unterdrücken und die HR positiv beeinflussen. Dagegen zeigen Dominguez-Bendala et al., (2006), dass PARP-1-defiziente murine embryonale Stammzellen, im Gegensatz zu Ligase4- und DNA-PKcs-defizienten Zellen, eine Erhöhung der HR-Rate verursachen. In dieser Studie untersuchten die Autoren die Frequenzen des *gene targeting*, ein Mechanismus, der HR verwendet (Vasquez et al., 2001), in PARP-1-, Ligase4- und DNA-PKcs-defizienten murinen embryonalen Zellen. Sie beobachteten eine dreifache Erhöhung in der TF (*gene targeting frequencies*) in PARP-1-defizienten Zellen gegenüber Kontrollzellen. Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse in den Studien von Dominguez-Bendala et al. und Hochegger et al. bzw. Saber et al., könnte an den verwendeten Methoden zur Messung der HR liegen.

Laut Literatur ist die Struktur und die Resektion der DSB-Enden nicht nur für die Bindung der HR-Substrate, sondern auch für die Wahl des Reparaturwegs entscheidend (Frank-Vaillant et al., 2002; Ira et al., 2004; Aylon et al., 2004; Scully und Xie, 2005). „Saubere Brüche“ mit komplementären Einzelstrangüberhängen, 5'- und 3'-Gruppen wie diese, die durch Nukleasen generiert werden, können einwandfrei durch NHEJ beseitigt werden (Shrivastav et al., 2008). Dies ist konsistent mit der Beobachtung, dass die Mehrheit der I-SceI-induzierten DSBs über NHEJ in menschlichen Zellen beseitigt werden (Takashima et al., 2009). Nicht kompatible DNA-Enden und diejenigen mit modifizierten 5'-Phosphat- oder 3'-Hydroxyl-Gruppen können nicht einfach durch DNA-Ligasen, insbesondere DNA-Ligase4, ligiert werden, weil diese hauptsächlich die Bildung der Phosphodiesterbrücke zwischen 5'-Phosphat und 3'-Hydroxyl-Enden katalysieren (Ellenberger und Tomkinson, 2008). Sie

5. Diskussion

müssen zuerst entfernt und die entstandene Lücke wieder aufgefüllt werden. Ionisierende Strahlung induziert DSBs, deren Enden nicht ligierbare 5'-OH- und 3'-Phosphat-Gruppen enthalten (Bertoncini und Meneghini, 1995; Henner et al., 1983). Solche modifizierte DNA-Enden können während des NHEJ durch die Polynukleotidekinase (PNK) durch ihre Interaktion mit XRCC4 korrigiert werden (Koch et al., 2004; Chappell et al., 2002). Denn die PNK verfügt über eine 5'-Kinase- und eine 3'-Phosphataseaktivität. Andere DSB-Enden müssen vor der Ligation prozessiert werden. Dazu werden z.B. die Nukleasen Artemis und/oder Mre11 benötigt. Artemis scheint sowohl an dem NHEJ als auch an der HR beteiligt zu sein (Beucher et al., 2009). Welche molekularen Mechanismen sind für die Funktionalität der Nuklease Artemis in der einen oder anderen Reparaturweg bleiben bisher unklar. Die Mehrheit der strahleninduzierten DSBs wird in der Zelle meist durch NHEJ beseitigt (Kap. 4.4.). Dies deutet darauf hin, dass ionisierende Strahlung meist DSBs, deren Prozessieren NHEJ-Proteine benötigen, induziert.

5.3.6. Ausblick

NHEJ-Mutanten weisen einen starken Reparaturdefekt in der G1- und der G2-Phase auf. Dementsprechend weisen HR-Mutanten einen kleinen Reparaturdefekt in der G2-Phase auf. Damit übernimmt NHEJ die dominierende Funktion in der G2-Phase. Ein der entscheidenden Faktoren für die Wahl des Reparaturwegs ist das Proteindimer Ku. Ku besitzt eine sehr hohe Bindungsaffinität für DSB-Enden und konkurriert mit anderen Faktoren wie HR-Nukleasen um die Bruchenden. Der NHEJ ist ein schneller Prozess und dies bewirkt, dass NHEJ in der G1- und der G2-Phase immer die HR vorausgeht. Dennoch damit die HR stattfinden kann, müssen die Bruchenden zuerst resektiert werden. Es stellt sich die Frage, ob für diesen Schritt das Ku-Protein zuerst von den Bruchenden verdrängt werden sollte, oder ob die HR-Nukleasen die Ku-gebundenen Bruchenden resektieren können. Um diese Frage beantworten zu können, sollte die Live-Zellmikroskopie durchgeführt werden. Diese Methode erlaubt, das Schicksal der Zelle live zu verfolgen. Das Protein Ku und die HR-Nukleasen wie CtIP und Mre11 werden in Plasmidvektoren einkloniert, die eine Sequenz für fluoreszierende Marker wie GFP (*green fluorescence protein*) oder YFP (*yellow fluorescence protein*) enthalten. Die Zellen werden mit diesen Vektoren transfiziert. Nach Induktion der DSBs durch Bestrahlung werden die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop beobachtet. Das Schicksal der fluoreszenzmarkierten Proteine kann so verfolgt werden. Diese Methode wird bereits in unserem Labor optimiert.

5. Diskussion

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass NHEJ die dominierende Funktion in der G2-Phase übernimmt. Um den Anteil von NHEJ und HR in der DSB-Reparatur in der G2-Phase noch näher zu untersuchen, sollte die DSB-Reparaturkinetik von γ H2AX- und Rad51-Foci in WT-Zellen miteinander verglichen werden. γ H2AX-Foci markiert alle DSBs und Rad51-Foci nur solche, die durch HR beseitigt werden. Der Vergleich beider γ H2AX- und Rad51-Reparaturkinetiken erlaubt einen präzisen Anteil von der HR gegenüber die gesamten DSB-Ereignisse zu bestimmen.

Studien über die Wechselwirkung zwischen NHEJ und HR stoßen teilweise auf Widersprüche. Einige Studien deuten darauf, dass Defizienzen in NHEJ die HR aktiviert (Pierce et al., 2001; Delacote et al., 2002; Allen et al., 2002). Andere wiederum können keine Erhöhung der HR-Effizienz nach der NHEJ-Inhibition beobachten (Takashima et al., 2001). Um zu überprüfen, ob die HR den NHEJ-Defekt in NHEJ-Mutanten kompensieren könnte, sollte die DSB-Reparaturkinetik von NHEJ-Mutanten nach längeren Inkubationszeiten (da die HR ein langsamer Reparaturprozess ist) in der G2-Phase untersucht werden. Falls der NHEJ-defekt in NHEJ-Mutanten durch die HR kompensiert wird, sollte die Zahl an DSBs in G2-Zellen in diesen NHEJ-Mutanten vergleichbar zu der von G2-WT-Zellen sein. Eine andere Möglichkeit wäre die DSB-Reparaturkinetik von HR-Foci wie Rad51 oder RPA in NHEJ-defizienten Zellen und WT-Zellen zu vergleichen. Wenn die HR in Abwesenheit von NHEJ zunehmend aktiviert wird, sollte die Anzahl an HR-Foci in NHEJ-defizienten Zellen höher als in WT-Zellen sein. Die Messung der HR-Ereignisse kann auch über die Analyse von Schwesterchromatidenaustauschen (SCEs) erfolgen. HR-Mutanten weisen eine verminderte Rate an SCEs (Sonoda et al., 1999; Dronkert et al., 2000). Wenn die HR tatsächlich in NHEJ-Mutanten in der G2-Phase erhöht wird, sollte die Anzahl an SCEs nach Bestrahlung in diesen Mutanten höher als in WT-Zellen sein.

5.4. Die Rolle von ATM und Artemis in dem NHEJ und der HR

Wie im Kap. 4.3. beschrieben, wurde die DSB-Reparatur von ATM- und Artemis-defizienten Zellen in der G1- und der G2-Phase analysiert. Diese zeigen in der G1-Phase zu späteren Zeiten einen kleinen und ähnlichen Reparaturdefekt. Im Vergleich zu WT-Zellen lassen ATM bzw. Artemis defiziente Zellen mindestens 15 % der DSBs in der G1-Phase unrepariert (Abb. 4.7.A, 4.8.A und 4.9.A). Dies zeigt, dass ATM und Artemis an der DSB-Reparatur über NHEJ in der G1-Phase beteiligt sind und bestätigt die Studien von Riballo et al, (2004). Diese Autoren zeigten anhand der γ H2AX-Immunfluoreszenzmikroskopie, dass ATM- und

5. Diskussion

Artemis-defizienten Zellen einen kleinen und ähnlichen Reparaturdefekt in der G0-Phase aufweisen. Zudem ist die ATM/Artemis-abhängige Reparatur von DNA-PKcs abhängig. Mindestens 10 % der DSBs blieben in diesen Mutanten, selbst nach längeren Inkubationszeiten (über 24 h), unrepariert (Riballo et al., 2004). ATM- und Artemis-Mutanten weisen eine ähnlich starke Strahlensensitivität auf, die auf den Reparaturdefekt zurückzuführen ist (Riballo et al., 2004; Kühne et al., 2004). Die mittels siRNA simultane Depletion von ATM und Artemis in HeLa-Zellen verursacht keine Verdoppelung des Reparaturdefekts verglichen zu den einzelnen ATM- und Artemis-Reparaturdefekten in der G1-Phase (Abb. 4.8.A). Dies lässt vermuten, dass Artemis und ATM am gleichen Reparaturweg in der G1-Phase beteiligt sind. Diese Annahme konnte bereits in Epistasisanalysen mit dem ATM-Inhibitor in Artemis-defizienten Zellen nachgewiesen werden (Deckbar et al., 2007; Riballo et al., 2004). Die in ATM- und Artemis-defizienten Zellen verbliebenen DSBs repräsentieren diejenigen, die mit einer langsamen Kinetik beseitigt werden. Es wurde postuliert, dass diese Minderheit an DSBs komplexe Bruchenden besitzt, wie z.B. diese mit modifizierten Basen oder veränderten Bruchstrukturen, für dessen Reparatur ATM und Artemis benötigt wird. Im Einklang mit dieser Hypothese wurde gezeigt, dass die Behandlung von ATM- und Artemis-defizienten Zellen mit Alpha-Strahlen einen stärkeren Reparaturdefekt als mit Röntgenstrahlen verursacht. Alpha-Strahlen sind bekannt, dass sie dicht ionisierend sind und deswegen DSBs mit komplexen Bruchstrukturen verursachen. Bei dieser Behandlung verbleiben 25–30 % der DSBs unrepariert (Riballo et al., 2004). Zudem wurde gezeigt, dass sowohl ATM- als auch Artemis-defiziente Zellen DSBs mit einfachen Bruchenden genauso effizient wie WT-Zellen beseitigen können (Riballo et al., 2004). Dazu wurden Zellen mit Etoposid behandelt, bei dem es sich um einen Topoisomerase II-Inhibitor handelt. Aufgrund des Reaktionsmechanismus von Etoposid verursacht die Behandlung mit diesem Inhibitor gleichförmige DSBs mit relativ einfachen Endstrukturen. Vor der Ligation müssen die Bruchenden zuerst prozessiert werden (Riballo et al., 2004). Artemis verfügt über eine 5'- und eine 3'-Endonukleaseaktivität und kann DSBs mit unterschiedlichen Strukturen, darunter 3'- und 5'-Überhänge, Haarnadelnstrukturen, die im Lauf der V(D)J-Rekombination entstehen, prozessieren (Ma et al., 2002; Ma et al., 2005a). Da ATM und Artemis nachweislich im selben Reparaturweg interagieren, konnte angenommen werden, dass ATM die Endonukleaseaktivität von Artemis durch Phosphorylierung reguliert (Riballo et al., 2004). Eine spätere Veröffentlichung zeigt jedoch, dass die Aktivierung der Endonuklease Artemis nicht ATM abhängig ist, sondern erst durch die Autophosphorylierung von DNA-PKcs induziert wird (Goodarzi et al., 2006). Denn es

5. Diskussion

wurde gezeigt, dass DSBs mit überhängenden Enden von Ku gebunden werden. Ku rekrutiert DNA-PKcs an den Bruchenden, danach erfolgt die Autophosphorylierung von DNA-PKcs. Diese bewirkt eine Konformationsänderung von an DSB-Überhängen gebundenem DNA-PKcs. Dadurch werden die Überhänge durch Artemis erkannt und aufgelöst. Der nun entstandene DSB mit glatten Enden weist jetzt eine geringe Bindungsaffinität für DNA-PKcs auf, sodass DNA-PKcs sich von den DNA-Enden ablöst. Die freien DNA-Enden werden dann zugänglich für das weitere Prozessieren durch andere NHEJ-Faktoren (Goodarzi et al., 2006). Auch die Tatsache, dass ATM für die Auflösung von Haarnadelstrukturen durch Artemis im Laufe der V(D)J-Rekombination nicht benötigt wird, deutet darauf hin, dass die Nukleaseaktivität von Artemis unabhängig von ATM reguliert wird. Aus diesen Beobachtungen kann geschlossen werden, dass Artemis diese Minderheit an DSBs abhängig von DNA-PKcs prozessiert. Die genaue Funktion von ATM in der Artemis-abhängigen DSB-Reparatur während des NHEJ soll noch geklärt werden. In einer späteren veröffentlichten Studie zeigen Goodarzi et al. (2008), dass die Funktionalität von ATM nicht unbedingt durch die Komplexität der DSB-Enden induziert wird. So weisen ATM-defiziente Zellen in der G1-Phase nach unterschiedlichen Behandlungen eine fast ähnliche Reparatureffizienz auf. ATM-defiziente Zellen, die mit Gamma-Strahlen bestrahlt wurden, weisen eine fast ähnliche Reparatureffizienz wie mit Neocarzinostatin (NCS)-behandelte AT-Zellen auf. NCS ist eine Chemikalie, die chemisch komplexe DSB-Enden generiert, die nicht einfach zusammenligiert werden können (Dedon und Goldberg, 1992). Auch mit Kohlenstoff K-Ionen bestrahlten AT-Zellen zeigen eine relativ leichte Verschlechterung des Reparaturdefekts gegenüber denjenigen, die mit Gamma-Strahlen bestrahlt wurden, 20–25 % der DSBs bleiben unrepariert (Goodarzi et al., 2008). Kohlenstoff K-Ionen sind dafür bekannt, dass sie sehr komplexe Schäden in der DNA generiert, jedoch im Gegensatz zu Alpha-Strahlen sind die DSBs isoliert und nicht an einer Stelle konzentriert, was die Auszählung der γ H2AX-Foci erleichtert. Wäre die Notwendigkeit von ATM bei der DSB-Reparatur auf die Komplexität der DSBs zurückzuführen, müsste der Reparaturdefekt in Kohlenstoff K-Ionen-behandelten AT-Zellen größer sein. Aus diesen Beobachtungen wurde geschlussfolgert, dass ATM für die Reparatur von komplexen Brüchen in der G1-Phase nicht zwingend erforderlich ist (Goodarzi et al., 2008). Stattdessen wurde beobachtet, dass der Anteil an unreparierten DSBs (15–25 %) in ATM-Mutanten mit dem Anteil an Heterochromatin in Säugerzellen korreliert (Goodarzi et al., 2008). Dies führt zur Vermutung, dass ATM an der DSB-Reparatur von in Heterochromatin induzierten DSBs beteiligt sein könnte. Tatsächlich zeigten Goodarzi et al. (2009), dass die Mehrheit der DSBs in Zellen, in denen ATM inhibiert wurde, schnell

5. Diskussion

repariert wird. Dagegen bleibt die Mehrheit der DSBs, die innerhalb des Heterochromatins zu finden sind, in der Abwesenheit von ATM beinahe erhalten (Goodarzi et al., 2009). Dies deutet darauf hin, dass die Mehrheit der verbliebenen DSBs in ATM-defizienten Zellen innerhalb oder in der Nähe des Heterochromatins lokalisieren. Die DSBs, die außerhalb des Heterochromatins, d.h. im Euchromatin generiert werden und ca. 75 % der gesamten DSBs repräsentieren, werden durch klassische NHEJ-Faktoren beseitigt. Weitere Untersuchungen zeigen, dass Defizienzen in Faktoren, die bei der Ausbildung des Heterochromatins beteiligt sind wie KAP-1 (*KRAB-associated protein 1*), HP1 (*Heterochromatin 1*) und Histondeacetylasen (HDAC) die ATM-abhängige DSB-Reparatur in der Zelle in der G1-Phase aufhebt (Goodarzi et al., 2008; Goodarzi et al., 2009). Beim Eintritt eines DSBs in der Zelle wird KAP-1 am Serin 824 durch ATM phosphoryliert (Li et al., 2007; Ziv et al., 2006). Dadurch wird das Chromatin aufgelockert. Somit trägt ATM zur Dekondensation des Chromatins bei. Aus diesen Beobachtungen, wurde geschlussfolgert, dass ATM den Zugang von Reparaturproteinen zu DSBs, die innerhalb oder in der Nähe des Heterochromatins entstehen, durch Auflockerung des Heterochromatins erleichtert (Goodarzi et al., 2008; Goodarzi et al., 2009). Die Relaxation vom Heterochromatin erfordert mehrere Schritte, von denen einige unabhängig von ATM ablaufen. So bewirkt die schnelle Dissoziation von HP1 aus dem Heterochromatin die Zugänglichkeit von Reparaturproteinen zur DSB-Stelle in der G1-Phase. Diese Dissoziation ist vermittelt durch die Phosphorylierung von HP1 an Threonin 51 durch CK2 (Casein Kinase 2) (Ayoub et al., 2008; Ayoub et al., 2009). Auch die örtliche Entspannung des Chromatins in der Nähe von DSBs ist durch einen ATP-abhängigen Mechanismus vermittelt (Kruhlak et al., 2006). Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass mehrere Mechanismen in der DSB-Reparatur innerhalb des Heterochromatins in der G1-Phase involviert sind. Der Zusammenhang zwischen der ATM- und Artemis-abhängige DSB-Reparatur in der G1-Phase bleibt dennoch unklar. Werden die DSBs, die innerhalb des Heterochromatins entstehen und ATM benötigen auch durch Artemis prozessiert? Obwohl es deutlich nachgewiesen wurde, dass die in Heterochromatin induzierten DSBs ATM für deren Reparatur benötigen, kann nicht ausgeschlossen werden, dass eine andere Untermenge an DSBs ATM, und vermutlich auch Artemis abhängig von ihrer Bruchstrukturen, benötigt.

Obwohl ATM mehrere Proteine wie BRCA1, cAbl, BLM, H2AX und NBS1, die an der HR beteiligt sind, phosphoryliert (Matsuoka et al., 2007), war sein Rolle in der Regulation der HR nicht vollständig geklärt. In den Studien von Golding et al. (2004) wurde gezeigt, dass ATM für die HR-Induktion essentiell ist. Dabei wurden die Studien mit Hilfe eines Stellen-spezifischen HR-Reporters, (DR-GFP) in ATM-inhibierten Zellen verwendet. Dagegen zeigte

5. Diskussion

eine andere Veröffentlichung, dass AT-Zellen eine normale HR-Effizienz haben (Bolderson et al., 2004). Hierbei wurde ein anderer HR-Reporter-Assay (SCneo) verwendet. Studien, die sowohl DR-GFP als auch SCneo als HR-Reporter verwendeten, zeigten, dass ATM für eine effiziente HR-Induktion nicht essentiell ist (Sakamoto et al., 2007). Diese scheinbar widersprüchlichen Befunde könnten daran liegen, dass verschiedene Methoden für die Inhibierung von ATM und die HR-Studien verwendet werden. Golding et al. (2004) studierten die Rolle von ATM in der HR durch Inhibition von ATM durch Koffein oder durch Anwendung eines dominanten negativen Form von ATM. Allerdings ist die in diesen Studien verwendete Konzentration von Koffein (2 mM) auch dafür bekannt, dass sie ATR, ein Regulator der HR inhibiert (Sarkaria et al., 1999). Außerdem kann eine dominant negative Form von ATM nicht 100%ig die ATM-Defizienz nachahmen.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass ATM- und Artemis-defizienten Zellen einen kleinen Reparaturdefekt in der G2-Phase aufweisen (Abb. 4.7.B, 4.8.B, 4.9.B). Ähnlich wie in der G1-Phase sind sie auch an einem gemeinsamen Reparaturweg beteiligt (Abb. 4.8.B, Deckbar et al., 2007). Dieser beobachtete Reparaturdefekt in der G2-Phase könnte sowohl auf einem NHEJ- als auch HR-Reparaturdefekt zurückgeführt werden. Auffällig ist, dass der Reparaturdefekt der ATM- und Artemis-defizienten Zellen mit dem der HR-Mutanten in der G2-Phase vergleichbar ist (Abb. 4.11.B.). Dieses Ergebnis gibt Hinweis darauf, dass ATM und Artemis in der G2-Phase an der HR beteiligt sein könnten. Zur Überprüfung dieser Vermutung wurden im Rahmen dieser Arbeit ATM mit dem ATM-Inhibitor (ATMi) in HR- und NHEJ-defizienten Zellen inhibiert (Abb. 4.12., 4.20., 4.21.). Mit ATMi-behandelten HR-Mutanten zeigen sowohl in der G1- als auch der G2-Phase einen ATM-ähnlichen Reparaturdefekt (Abb. 4.12.). Das Ausbleiben einer zusätzlichen Erhöhung des HR-Defekts in der G2-Phase ist ein Indiz, dass ATM in der G2-Phase an der HR beteiligt ist, während es in der G1-Phase ein Faktor des NHEJ ist. Diese Hypothese wird durch die Beobachtung unterstützt, dass die ATM-Inhibition bei NHEJ-Mutanten keinen zusätzlichen Reparaturdefekt in der G1-Phase, wohl aber einen zusätzlichen Reparaturdefekt in der G2-Phase, verursacht (Abb. 4.20., 4.21.). Zudem verursacht die DNA-PKcs-Inhibition keinen zusätzlichen Reparaturdefekt in NHEJ-Mutanten in beiden Zellzyklusphasen (Abb. 4.20., 4.21.). Dies ist erwartungsgemäß, da DNA-PKcs ein NHEJ-Faktor ist. Damit ist die durch ATMi-Behandlung hervorgerufene Erhöhung des NHEJ-Reparaturdefekts in der G2-Phase tatsächlich auf die Inhibition von ATM zurückzuführen.

5. Diskussion

Die Rolle von ATM in der HR wurde bereits in den Studien von Morrison et al. (2000) angedeutet. So zeigen die Autoren, dass die Ausbildung von Rad51-Foci in WT-Zellen deutlich schneller als in ATM-defizienten Zellen erfolgt. Dies zeigt, dass ATM für die Initiation der HR wichtig ist. Simultane Defizienzen in ATM und Ku70 (NHEJ) führen in DT-40-Zellen in der G2- und der späten S/G2-Phase zu einer starken Erhöhung der strahleninduzierten Chromosomenaberrationen im Vergleich zu den einzelnen Mutanten. Dagegen zeigen ATM/Rad54 (HR)-defiziente Zellen keine wesentliche Erhöhung der strahleninduzierten chromosomalen Aberrationen in der G2- und der späten S/G2-Phase im Vergleich zu den einzelnen Mutanten (Morrison et al., 2000). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass ATM die HR in der S- und G2-Phase reguliert. Eine Rolle für Artemis in der HR blieb noch ungeklärt. Jedoch zeigen Experimente in unserem Labor, dass ATM und Artemis an der HR beteiligt sind (Beucher et al., 2009). Um dies herauszufinden, entwickelten die Autoren einen BrdU-Assay, das auf der mikroskopischen Detektion von BrdU, das in die DNA im Laufe der DSB-Reparatur durch HR eingebaut wird, basiert. Dementsprechend zeigen nur S- und G2-Zellen ein positives BrdU-Signal. Die Zugabe von Aphidicolin verhindert den Durchgang von bestrahlten S-Zellen in der G2-Phase und erlaubt gleichzeitig eine Unterscheidung von S- und G2-Zellen in der Immunfluoreszenzmikroskopie, da G2-Zellen, im Gegensatz zu S-Zellen klare auswertbare BrdU-Foci aufweisen. Die Anzahl an BrdU-Foci in der G2-Phase war in HR-, ATM- und Artemis-depletierten Zellen, im Vergleich zu WT-Zellen sehr niedrig bzw. die Foci waren kaum vorhanden. Dagegen hatte die Depletion von NHEJ-Faktoren wie Ku80 und Ligase4 kaum einen Einfluss auf die Ausbildung der BrdU-Foci. Diese Beobachtungen gaben einen Hinweis darauf, dass ATM und Artemis an der HR in der G2-Phase beteiligt sind. Auch der Nachweis von SCEs (*Sister Chromatid Exchange*) bestätigte die Annahme, dass ATM und Artemis in der G2-Phase benötigt werden (Beucher et al., 2009). Schwesterchromatidaustausch repräsentiert ein Marker für HR-Ereignisse (Sonoda et al., 1999). HR-defiziente Zellen zeigten im Vergleich zu Kontrollzellen eine verminderte Anzahl an spontane SCEs und durch Bestrahlung wurde die Zahl an SCEs in HR-defizienten Zellen, im Gegensatz zu Kontrollzellen nicht erhöht (Beucher et al., 2009). Dagegen war die Anzahl an spontanen SCEs in NHEJ-, ATM- und Artemis-depletierten Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen beinahe unverändert. Durch Bestrahlung wurde allerdings die zu erwartende Erhöhung an SCEs in ATM- und Artemis-depletierten Zellen unterdrückt (Beucher et al., 2009). Die normale spontane Rate an SCEs in ATM- und Artemis-defizienten Zellen, im Gegensatz zu HR-defizienten Zellen, könnte ein Hinweis darauf sein, dass ATM und Artemis keine Hauptkomponente der HR sind. Es wurde

5. Diskussion

weiterhin beobachtet, dass ATM und Artemis-defiziente Zellen beeinträchtigt sind, RPA- und Rad51-Foci zu bilden. Dagegen ist die RPA-Focibildung in BRCA2-defizienten Zellen normal (Beucher et al., 2009). Die Proteine RPA und Rad51 sind an der Initiation der HR beteiligt und lassen sich in S- und G2-Zellen als Foci nachweisen. Da Artemis und ATM einen Defekt in der Ausbildung dieser Foci zeigen, kann vermutet werden, dass ATM und Artemis an der Initiation der HR beteiligt sind. Andere Studien beobachteten, dass die I-SceI-induzierte HR in BRCA2-defizienten Zellen, aber nicht in Artemis-defizienten Zellen beeinträchtigt ist (Moynahan et al., 2001; Wang et al., 2004). Die Inhibition von ATM hatte auch einen minimalen Einfluss auf solche Brüche. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass Artemis und ATM keine Hauptkomponente der HR sind.

Studien in G1-Zellen haben gezeigt, dass die Endonukleaseaktivität von Artemis für das Prozessieren der Bruchenden abhängig von DNA-PKcs ist (Riballo et al., 2004). Tatsächlich wiesen Artemis-defizienten Zellen, in denen DNA-PKcs zusätzlich inhibiert wird, einen ähnlichen Reparaturdefekt wie DNA-PKcs-inhibierte WT-Zellen in der G0/G1-Phase. Dagegen ist in der G2-Phase der durch DNA-PKcs-Inhibition vergrößerte Reparaturdefekt von Artemis-defizienten Zellen (NHEJ ist der dominierende Reparaturweg in der G2-Phase) noch größer als derjenige in DNA-PKcs-defizienten WT-Zellen (Beucher et al., 2009). Dies weist darauf hin, dass Artemis und DNA-PKcs in der G2-Phase an unterschiedlichen Reparaturwegen beteiligt sind. Auch die Endonukleaseaktivität von Artemis ist für die HR-induzierte DSB-Reparatur in der G2-Phase notwendig, denn Artemis-defiziente Zellen, die mit einem Endonuklease-defizient Artemis-Vektor transfiziert wurden, einen Reparaturdefekt aufweisen. Dagegen stellt die Transfektion von Artemis-defizienten Zellen mit Wildtyp-Artemis das Reparaturvermögen dieser Zelle wieder her (Beucher et al., 2009). ATM und Artemis werden in der G1- und G2-Phase benötigt, aber beide Proteine stellen keine Hauptkomponente beider Reparaturwege dar.

Es wurde publiziert, dass ATR von ATM nach Bestrahlung in menschlichen Zellen aktiviert wird (Javaheri et al., 2006). ATR initiiert die HR durch Phosphorylierung von der Kinase Chk1 (Wang et al., 2004; Sorensen et al., 2005). Chk1 erleichtert die HR durch Phosphorylierung von Rad51, die die Wechselwirkung zwischen BRCA1 und Rad52 abschwächt. Die Regulation dieser Wechselwirkung spielt eine wichtige Rolle für die korrekte Bindung von Rad51 an das Chromatin (Bahassi et al., 2008). Die Aktivierung von ATR durch ATM lässt vermuten, dass ATM an der HR durch Aktivierung der ATR-Chk1-Kaskade beteiligt ist. Dies kann also einen Einfluss auf die HR-Effizienz haben, da sie der Zelle

5. Diskussion

genügende Zeit gibt, um die DSB-Reparatur zu vervollständigen. Dabei wird die Aktivität von CDK vermindert. CDK ist dafür bekannt, dass es die BRCA2-vermittelte HR durch Phosphorylierung von BRCA2 an Serinrest 3291 inhibiert (Esashi et al., 2005).

5.5. Die Rolle von MDC-1 und 53BP1 in der DSB-Reparatur

MDC-1 und 53 BP1 sind Mediatorproteine, die an der DNA-Schadensantwort über die ATM-Signalkaskade beteiligt sind. ATM übernimmt eine duale Funktion in der Regulation der DNA-Checkpoints und der DNA-Reparatur (Deckbar et al., 2007). Die Rolle von MDC-1 und 53BP1 an der normalen Schadensantwort nach ionisierender Strahlung, einschließlich Zellüberleben (Peng et al., 2003), Regulation der intra- und G2/M-Checkpoints (Wang et al., 2002; DiTullio et al., 2002; Lou et al., 2004; Mailand et al., 2007) und Einleitung der Apoptose (Lou et al., 2003; Yoo et al., 2005) ist bekannt. Weniger bekannt war ihr Beteiligung an der DSB-Reparatur. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass MDC-1 und 53BP1 an der ATM-abhängigen DSB-Reparatur in der G1- und der G2-Phase beteiligt sind (Kap. 4.3.4.). Beide Mediatoren teilen mit ATM einen ähnlichen Reparaturdefekt und deren Defizienzen verursachen in Mäusen eine genomische Instabilität, Checkpointdefekte und Wachstumsverzögerung. Es wäre durchaus vorstellbar, dass beide Mediatoren an der ATM-Schadensantwort über die gleiche Proteinkaskade beteiligt werden. Zudem interagiert MDC-1 und 53BP1 und dies ist für die Ausbildung von 53BP1-Foci und für die Rekrutierung von 53BP1 an der DSB-Stelle notwendig (Eliezer et al., 2009). Diese Hypothese wurde in Studien von Minter-Dykhouse et al. (2008) unterstützt. Diese Autoren zeigten durch Epistasisanalysen, dass MDC-1 und 53BP1 am gleichen Reparaturweg beteiligt sind, und dass MDC-1 *upstream* von 53BP1 in der ATM-Signalkaskade wirkt. Dennoch konnte diese Vermutung in Studien von Mochan et al. (2003) nicht belegt werden. Dort wurde gezeigt, dass beide Mediatoren zwar an der ATM-abhängigen DNA-Schadensantwort beteiligt sind, dies aber über unterschiedliche Wege erfolgt. Diese Diskrepanz in beiden Arbeitsgruppen könnte an der Auswahl der verwendeten Methoden liegen. Minter-Dykhouse et al. (2008) verwendeten *knockout* Zelllinien, dagegen wurde die Expression beider Proteinen in Studien von Mochan et al. (2003) durch siRNA inhibiert. Bei dieser Methode kann eine Restaktivität des depletierten Proteins nicht immer vollständig ausgeschlossen werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine mögliche Funktion von MDC-1 und 53BP1 in der DSB-Reparatur über NHEJ und HR untersucht. Die DSB-Reparaturstudien zeigen, dass MDC-1 und 53BP1-defizienten Zellen einen kleinen und ähnlichen Reparaturdefekt in der G1- und der G2-Phase aufweisen, der zudem vergleichbar zu demjenigen der ATM- und

5. Diskussion

Artemis-Mutanten ist (Abb. 4.9.). Dies führte zur Vermutung, dass MDC-1 und 53BP1 an der ATM-abhängigen Reparaturweg beteiligt sein könnten. Epistasisanalysen mit dem ATM-Inhibitor bestätigten diese Hypothese (Abb. 4.10.). Dadurch konnte gezeigt werden, dass MDC-1 und 53BP1 am NHEJ in der G1-Phase und womöglich an der HR über ATM in der G2-Phase beteiligt sind. In einigen Studien wird eine Beteiligung von 53BP1 an dem DNA-PKcs- und XRCC4-abhängigen NHEJ angenommen (Riballo et al., 2004; Xie et al., 2007). Für MDC-1 konnten Lou et al. (2004) nachweisen, dass die Defizienz in MDC-1 zu einem Defekt in der DNA-PK-abhängigen DSB-Reparatur führt, und dass MDC-1 mit dem DNA-PK-Komplex interagiert und die Autophosphorylierung von DNA-PKcs reguliert. Die Autophosphorylierung von DNA-PKcs ist wichtig für die DSB-Reparatur (Chan et al., 2002; Ding et al., 2003). Die Veröffentlichung von Lou et al. (2004) ist konsistent mit dem in dieser Arbeit gezeigten Reparaturdefekt der MDC-1-Mutant in der G1-Phase (Abb. 4.9.). Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass 53BP1 und MDC-1 in der G1-Phase Komponente des NHEJ sind. Da beide Proteine einen ATM-ähnlichen Reparaturdefekt in der G2-Phase aufweisen und zudem epistatisch zu ATM sind, könnte angenommen werden, dass sie auch in der G2-Phase über HR wirken. Eine Beteiligung von MDC-1 an der HR wurde bereits angedeutet, da MDC-1 den Schwesterchromatidaustausch, ein wichtiges HR-Ereignis, und die Bindungsaffinität von Rad51 an den Bruchenden reguliert (Xie et al., 2007; Zhang et al., 2005). Eine mögliche Teilnahme von 53BP1 an der HR wurde jedoch in der Studie von Xie et al. (2007) ausgeschlossen. Sie zeigten, dass die Depletion von 53BP1 mittels siRNA in menschlichen U2OS-Zellen die HR-Aktivität nach Induktion von DSBs durch die I-SceI-Endonuklease deutlich erhöht. Diese Beobachtung ist konsistent mit einer neuen veröffentlichten Studie, die zeigt, dass 53BP1 die HR in BRCA1-defizienten Zellen inhibiert (Bunting et al., 2010). Die Deletion von 53BP1 in diesen Zellen stellt das HR-Reparaturvermögen dieser Zellen wieder. Einen Grund dafür soll die Blockierung der ATM-abhängigen Resektion (und die damit entstandene einzelsträngigen DNA-Fragmente, Substrate der HR) der Bruchenden durch 53BP1 sein.

Zusammengefasst konnte gezeigt werden, dass beide Proteine MDC-1 und 53BP1 eine Rolle in der Reparatur einer Minderheit an DSBs in der G1- und der G2-Phase übernehmen. Zudem sind sie epistatisch zu ATM in der G1- und der G2-Phase. Diese Ergebnisse zeigen, dass beide Proteine in der G1-Phase am NHEJ beteiligt sind und schließen eine mögliche Beteiligung beider Proteine an der HR in der G2-Phase nicht aus.

5. Diskussion

5.5.1. Ausblick

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass MDC-1 und 53BP1 für die Reparatur einer Minderheit an DSBs in der G1-Phase, genauso wie ATM und Artemis, notwendig sind. Außerdem sind beide Proteine in der G1-Phase epistatisch zu ATM. Dies zeigt, dass MDC-1 und 53BP1 Komponente des NHEJ in der G1-Phase sind. Auch in der G2-Phase wurde gezeigt, dass MDC-1 und 53BP1 einen kleinen Reparaturdefekt aufweisen und epistatisch zu ATM sind. Dies wirft die Frage auf, ob auch MDC-1 und 53BP1 an der HR, wie es für ATM demonstriert wird (Beucher et al., 2009), beteiligt sind. Um dies zu überprüfen, sollte die Ausbildung von Rad51-Foci in MDC-1- und 53BP1-defizienten Zellen analysiert werden. Falls MDC-1 und 53BP1 Komponente der HR sind, sollte die Ausbildung von Rad51-Foci in MDC-1 und 53BP1-defizienten Zellen stark beeinträchtigt sein, d.h die Induktion der Rad51-Foci sollte in diesen Zellen im Vergleich zu WT-Zellen stets kleiner sein. Auch die Zahl der strahleninduzierten SCEs sollte in MDC-1- und 53BP1-defizienten Zellen kleiner als in WT-Zellen sein. In dieser Arbeit wurde nicht direkt untersucht, ob MDC-1 und 53BP1 zueinander epistatisch sind. Die Tatsache, dass beide Proteine epistatisch zu ATM in der G1- und der G2-Phase sind, könnte ein Hinweis darauf sein. Dennoch um dies zu überprüfen, sollte die DSB-Reparaturkinetik von MDC-1/53BP1-defizienten Zellen durchgeführt werden und mit derjenigen der einzelnen Mutanten verglichen werden. Wenn MDC-1 und 53BP1 zueinander epistatisch sind, sollte die Reparaturkinetik der Doppelmutante identisch zu derjenigen der MDC-1- und 53BP1-Mutante in beiden Zellzyklusphasen sein.

6. Literaturverzeichnis

- Adachi,N., Ishino,T., Ishii,Y., Takeda,S., and Koyama,H. (2001): DNA ligase IV-deficient cells are more resistant to ionizing radiation in the absence of Ku70: Implications for DNA double-strand break repair. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 98:12109-12113.
- Adachi,N., So,S., and Koyama,H. (2004): Loss of nonhomologous end joining confers camptothecin resistance in DT40 cells. Implications for the repair of topoisomerase I-mediated DNA damage. *J.Biol.Chem.*, 279:37343-37348.
- Agami,R. and Bernards,R. (2000): Distinct initiation and maintenance mechanisms cooperate to induce G1 cell cycle arrest in response to DNA damage. *Cell*, 102:55-66.
- Ahel,I., Rass,U., El Khamisy,S.F., Katyal,S., Clements,P.M., McKinnon,P.J., Caldecott,K.W., and West,S.C. (2006): The neurodegenerative disease protein aprataxin resolves abortive DNA ligation intermediates. *Nature*, 443:713-716.
- Ahnesorg,P., Smith,P., and Jackson,S.P. (2006): XLF interacts with the XRCC4-DNA ligase IV complex to promote DNA nonhomologous end-joining. *Cell*, 124:301-313.
- Albala,J.S., Thelen,M.P., Prange,C., Fan,W., Christensen,M., Thompson,L.H., and Lennon,G.G. (1997): Identification of a novel human RAD51 homolog, RAD51B. *Genomics*, 46:476-479.
- Ame,J.C., Spenlehauer,C., and de Murcia,G. (2004): The PARP superfamily. *Bioessays*, 26:882-893.
- Anderson,C.W. and Lees-Miller,S.P. (1992): The nuclear serine/threonine protein kinase DNA-PK. *Crit Rev.Eukaryot.Gene Expr.* , 2:283-314.
- Antoniou,A., Pharoah,P.D., Narod,S., Risch,H.A., Eyfjord,J.E., Hopper,J.L., Loman,N., Olsson,H., Johannsson,O., Borg,A., Pasini,B., Radice,P., Manoukian,S., Eccles,D.M., Tang,N., Olah,E., Anton-Culver,H., Warner,E., Lubinski,J., Gronwald,J., Gorski,B., Tulinius,H., Thorlacius,S., Eerola,H., Nevanlinna,H., Syrjakoski,K., Kallioniemi,O.P., Thompson,D., Evans,C., Peto,J., Lalloo,F., Evans,D.G., and Easton,D.F. (2003): Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. *Am.J.Hum.Genet.*, 72:1117-1130.
- Appella,E. and Anderson,C.W. (2001): Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stresses. *Eur.J.Biochem.*, 268:2764-2772.
- Argueso,J.L., Westmoreland,J., Mieczkowski,P.A., Gawel,M., Petes,T.D., and Resnick,M.A. (2008): Double-strand breaks associated with repetitive DNA can reshape the genome. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 105:11845-11850.
- Arnaudeau,C., Lundin,C., and Helleday,T. (2001): DNA double-strand breaks associated with replication forks are predominantly repaired by homologous recombination involving an exchange mechanism in mammalian cells. *J.Mol.Biol.*, 307:1235-1245.

6. Literaturverzeichnis

- Aylon,Y., Liefshitz,B., and Kupiec,M. (2004): The CDK regulates repair of double-strand breaks by homologous recombination during the cell cycle. *EMBO J.*, 23:4868-4875.
- Ayoub,N., Jeyasekharan,A.D., Bernal,J.A., and Venkitaraman,A.R. (2008): HP1-beta mobilization promotes chromatin changes that initiate the DNA damage response. *Nature*, 453:682-686.
- Ayoub,N., Jeyasekharan,A.D., and Venkitaraman,A.R. (2009): Mobilization and recruitment of HP1: a bimodal response to DNA breakage. *Cell Cycle*, 8:2945-2950.
- Badie,C., Goodhardt,M., Waugh,A., Doyen,N., Foray,N., Calsou,P., Singleton,B., Gell,D., Salles,B., Jeggo,P., Arlett,C.F., and Malaise,E.P. (1997): A DNA double-strand break defective fibroblast cell line (180BR) derived from a radiosensitive patient represents a new mutant phenotype. *Cancer Res.*, 57:4600-4607.
- Bahassi,E.M., Ovesen,J.L., Riesenber,A.L., Bernstein,W.Z., Hasty,P.E., and Stambrook,P.J. (2008): The checkpoint kinases Chk1 and Chk2 regulate the functional associations between hBRCA2 and Rad51 in response to DNA damage. *Oncogene*, 27:3977-3985.
- Banath,J.P., Macphail,S.H., and Olive,P.L. (2004): Radiation sensitivity, H2AX phosphorylation, and kinetics of repair of DNA strand breaks in irradiated cervical cancer cell lines. *Cancer Res.*, 64:7144-7149.
- Banin,S., Moyal,L., Shieh,S., Taya,Y., Anderson,C.W., Chessa,L., Smorodinsky,N.I., Prives,C., Reiss,Y., Shiloh,Y., and Ziv,Y. (1998): Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. *Science*, 281:1674-1677.
- Banin,S., Moyal,L., Shieh,S., Taya,Y., Anderson,C.W., Chessa,L., Smorodinsky,N.I., Prives,C., Reiss,Y., Shiloh,Y., and Ziv,Y. (1998): Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. *Science*, 281:1674-1677.
- Bao,S., Tibbetts,R.S., Brumbaugh,K.M., Fang,Y., Richardson,D.A., Ali,A., Chen,S.M., Abraham,R.T., and Wang,X.F. (2001): ATR/ATM-mediated phosphorylation of human Rad17 is required for genotoxic stress responses. *Nature*, 411:969-974.
- Baskaran,R., Wood,L.D., Whitaker,L.L., Canman,C.E., Morgan,S.E., Xu,Y., Barlow,C., Baltimore,D., Wynshaw-Boris,A., Kastan,M.B., and Wang,J.Y. (1997): Ataxia telangiectasia mutant protein activates c-Abl tyrosine kinase in response to ionizing radiation. *Nature*, 387:516-519.
- Bassing,C.H., Chua,K.F., Sekiguchi,J., Suh,H., Whitlow,S.R., Fleming,J.C., Monroe,B.C., Ciccone,D.N., Yan,C., Vlasakova,K., Livingston,D.M., Ferguson,D.O., Scully,R., and Alt,F.W. (2002): Increased ionizing radiation sensitivity and genomic instability in the absence of histone H2AX. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 99:8173-8178.
- Bassing,C.H. and Alt,F.W. (2004): The cellular response to general and programmed DNA double strand breaks. *DNA Repair (Amst)*, 3:781-796.
- Baumann,P., Benson,F.E., and West,S.C. (1996): Human Rad51 protein promotes ATP-dependent homologous pairing and strand transfer reactions in vitro. *Cell*, 87:757-766.

6. Literaturverzeichnis

- Baumann,P. and West,S.C. (1998): Role of the human RAD51 protein in homologous recombination and double-stranded-break repair. *Trends Biochem.Sci.*, 23:247-251.
- Baumann,P. and Cech,T.R. (2000): Protection of telomeres by the Ku protein in fission yeast. *Mol.Biol.Cell*, 11:3265-3275.
- Ben Omran,T.I., Cerosaletti,K., Concannon,P., Weitzman,S., and Nezarati,M.M. (2005): A patient with mutations in DNA Ligase IV: clinical features and overlap with Nijmegen breakage syndrome. *Am.J.Med.Genet.A*, 137A:283-287.
- Benson,F.E., Baumann,P., and West,S.C. (1998): Synergistic actions of Rad51 and Rad52 in recombination and DNA repair. *Nature*, 391:401-404.
- Bernstein,K.A. and Rothstein,R. (2009): At loose ends: resecting a double-strand break. *Cell*, 137:807-810.
- Bertoncini,C.R. and Meneghini,R. (1995): DNA strand breaks produced by oxidative stress in mammalian cells exhibit 3'-phosphoglycolate termini. *Nucleic Acids Res.*, 23:2995-3002.
- Beucher,A., Birraux,J., Tchouandong,L., Barton,O., Shibata,A., Conrad,S., Goodarzi,A.A., Kremler,A., Jeggo,P.A., and Lobrich,M. (2009): ATM and Artemis promote homologous recombination of radiation-induced DNA double-strand breaks in G2. *EMBO J.*, 28:3413-3427.
- Bezzubova,O., Silbergleit,A., Yamaguchi-Iwai,Y., Takeda,S., and Buerstedde,J.M. (1997): Reduced X-ray resistance and homologous recombination frequencies in a RAD54-/- mutant of the chicken DT40 cell line. *Cell*, 89:185-193.
- Bharadwaj,R. and Yu,H. (2004): The spindle checkpoint, aneuploidy, and cancer. *Oncogene*, 23:2016-2027.
- Bhattacharyya,A., Ear,U.S., Koller,B.H., Weichselbaum,R.R., and Bishop,D.K. (2000): The breast cancer susceptibility gene BRCA1 is required for subnuclear assembly of Rad51 and survival following treatment with the DNA cross-linking agent cisplatin. *J.Biol.Chem.*, 275:23899-23903.
- Bianco,P.R., Tracy,R.B., and Kowalczykowski,S.C. (1998): DNA strand exchange proteins: a biochemical and physical comparison. *Front Biosci.*, 3:D570-D603
- Blier,P.R., Griffith,A.J., Craft,J., and Hardin,J.A. (1993): Binding of Ku protein to DNA. Measurement of affinity for ends and demonstration of binding to nicks. *J.Biol.Chem.*, 268:7594-7601.
- Block,W.D., Yu,Y., Merkle,D., Gifford,J.L., Ding,Q., Meek,K., and Lees-Miller,S.P. (2004): Autophosphorylation-dependent remodeling of the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit regulates ligation of DNA ends. *Nucleic Acids Res.*, 32:4351-4357.
- Boiteux,S. and Guillet,M. (2004): Abasic sites in DNA: repair and biological consequences in *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Repair (Amst)*, 3:1-12.
- Branzei,D. and Foiani,M. (2008): Regulation of DNA repair throughout the cell cycle. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.*, 9:297-308.

6. Literaturverzeichnis

- Buck,D., Moshous,D., de Chasseval,R., Ma,Y., le Deist,F., Cavazzana-Calvo,M., Fischer,A., Casanova,J.L., Lieber,M.R., and de Villartay,J.P. (2006): Severe combined immunodeficiency and microcephaly in siblings with hypomorphic mutations in DNA ligase IV. *Eur.J.Immunol.*, 36:224-235.
- Bunting,S.F., Callen,E., Wong,N., Chen,H.T., Polato,F., Gunn,A., Bothmer,A., Feldhahn,N., Fernandez-Capetillo,O., Cao,L., Xu,X., Deng,C.X., Finkel,T., Nussenzweig,M., Stark,J.M., and Nussenzweig,A. (2010): 53BP1 inhibits homologous recombination in Brca1-deficient cells by blocking resection of DNA breaks. *Cell*, 141:243-254.
- Burma,S., Chen,B.P., Murphy,M., Kurimasa,A., and Chen,D.J. (2001): ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *J.Biol.Chem.*, 276:42462-42467.
- Callebaut,I., Malivert,L., Fischer,A., Mornon,J.P., Revy,P., and de Villartay,J.P. (2006): Cernunnos interacts with the XRCC4 x DNA-ligase IV complex and is homologous to the yeast nonhomologous end-joining factor Nej1. *J.Biol.Chem.*, 281:13857-13860.
- Calsou,P., Delteil,C., Frit,P., Drouet,J., and Salles,B. (2003): Coordinated assembly of Ku and p460 subunits of the DNA-dependent protein kinase on DNA ends is necessary for XRCC4-ligase IV recruitment. *J.Mol.Biol.*, 326:93-103.
- Canman,C.E., Lim,D.S., Cimprich,K.A., Taya,Y., Tamai,K., Sakaguchi,K., Appella,E., Kastan,M.B., and Siliciano,J.D. (1998): Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53. *Science*, 281:1677-1679.
- Cao,L., Alani,E., and Kleckner,N. (1990): A pathway for generation and processing of double-strand breaks during meiotic recombination in *S. cerevisiae*. *Cell*, 61:1089-1101.
- Cartwright,R., Tambini,C.E., Simpson,P.J., and Thacker,J. (1998): The XRCC2 DNA repair gene from human and mouse encodes a novel member of the recA/RAD51 family. *Nucleic Acids Res.*, 26:3084-3089.
- Cartwright,R., Dunn,A.M., Simpson,P.J., Tambini,C.E., and Thacker,J. (1998): Isolation of novel human and mouse genes of the recA/RAD51 recombination-repair gene family. *Nucleic Acids Res.*, 26:1653-1659.
- Casellas,R., Nussenzweig,A., Wuerffel,R., Pelandra,R., Reichlin,A., Suh,H., Qin,X.F., Besmer,E., Kenter,A., Rajewsky,K., and Nussenzweig,M.C. (1998): Ku80 is required for immunoglobulin isotype switching. *EMBO J.*, 17:2404-2411.
- Chan,D.W. and Lees-Miller,S.P. (1996): The DNA-dependent protein kinase is inactivated by autophosphorylation of the catalytic subunit. *J.Biol.Chem.*, 271:8936-8941.
- Chan,D.W., Ye,R., Veillette,C.J., and Lees-Miller,S.P. (1999): DNA-dependent protein kinase phosphorylation sites in Ku 70/80 heterodimer. *Biochemistry*, 38:1819-1828.
- Chan,D.W., Chen,B.P., Prithivirajsingh,S., Kurimasa,A., Story,M.D., Qin,J., and Chen,D.J. (2002): Autophosphorylation of the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit is required for rejoining of DNA double-strand breaks. *Genes Dev.*, 16:2333-2338.

6. Literaturverzeichnis

- Chang,C., Biedermann,K.A., Mezzina,M., and Brown,J.M. (1993): Characterization of the DNA double strand break repair defect in scid mice. *Cancer Res.*, 53:1244-1248.
- Chappell,C., Hanakahi,L.A., Karimi-Busheri,F., Weinfeld,M., and West,S.C. (2002): Involvement of human polynucleotide kinase in double-strand break repair by non-homologous end joining. *EMBO J.*, 21:2827-2832.
- Chappell,C., Hanakahi,L.A., Karimi-Busheri,F., Weinfeld,M., and West,S.C. (2002): Involvement of human polynucleotide kinase in double-strand break repair by non-homologous end joining. *EMBO J.*, 21:2827-2832.
- Chen,B.P., Uematsu,N., Kobayashi,J., Lerenthal,Y., Krempler,A., Yajima,H., Lobrich,M., Shiloh,Y., and Chen,D.J. (2007): Ataxia telangiectasia mutated (ATM) is essential for DNA-PKcs phosphorylations at the Thr-2609 cluster upon DNA double strand break. *J.Biol.Chem.*, 282:6582-6587.
- Chen,L., Morio,T., Minegishi,Y., Nakada,S., Nagasawa,M., Komatsu,K., Chessa,L., Villa,A., Lecis,D., Delia,D., and Mizutani,S. (2005): Ataxia-telangiectasia-mutated dependent phosphorylation of Artemis in response to DNA damage. *Cancer Sci.*, 96:134-141.
- Christian gertsen and Helmut Vogel (1993): *physik.* berlin,
- Clements,P.M., Breslin,C., Deeks,E.D., Byrd,P.J., Ju,L., Bieganski,P., Brenner,C., Moreira,M.C., Taylor,A.M., and Caldecott,K.W. (2004): The ataxia-oculomotor apraxia 1 gene product has a role distinct from ATM and interacts with the DNA strand break repair proteins XRCC1 and XRCC4. *DNA Repair (Amst)*, 3:1493-1502.
- Clever,B., Interthal,H., Schmuckli-Maurer,J., King,J., Sigrist,M., and Heyer,W.D. (1997): Recombinational repair in yeast: functional interactions between Rad51 and Rad54 proteins. *EMBO J.*, 16:2535-2544.
- Clever,B., Interthal,H., Schmuckli-Maurer,J., King,J., Sigrist,M., and Heyer,W.D. (1997): Recombinational repair in yeast: functional interactions between Rad51 and Rad54 proteins. *EMBO J.*, 16:2535-2544.
- Connelly,J.C. and Leach,D.R. (2004): Repair of DNA covalently linked to protein. *Mol.Cell*, 13:307-316.
- Corneo,B., Wendland,R.L., Deriano,L., Cui,X., Klein,I.A., Wong,S.Y., Arnal,S., Holub,A.J., Weller,G.R., Pancake,B.A., Shah,S., Brandt,V.L., Meek,K., and Roth,D.B. (2007): Rag mutations reveal robust alternative end joining. *Nature*, 449:483-486.
- Cortez,D., Wang,Y., Qin,J., and Elledge,S.J. (1999): Requirement of ATM-dependent phosphorylation of brca1 in the DNA damage response to double-strand breaks. *Science*, 286:1162-1166.
- Cortez,D., Guntuku,S., Qin,J., and Elledge,S.J. (2001): ATR and ATRIP: partners in checkpoint signaling. *Science*, 294:1713-1716.
- Critchlow,S.E. and Jackson,S.P. (1998): DNA end-joining: from yeast to man. *Trends Biochem.Sci.*, 23:394-398.

6. Literaturverzeichnis

- Cui,X., Yu,Y., Gupta,S., Cho,Y.M., Lees-Miller,S.P., and Meek,K. (2005): Autophosphorylation of DNA-dependent protein kinase regulates DNA end processing and may also alter double-strand break repair pathway choice. *Mol.Cell Biol.*, 25:10842-10852.
- Dai,Y., Kysela,B., Hanakahi,L.A., Manolis,K., Riballo,E., Stumm,M., Harville,T.O., West,S.C., Oettinger,M.A., and Jeggo,P.A. (2003): Nonhomologous end joining and V(D)J recombination require an additional factor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 100:2462-2467.
- Davis,A.P. and Symington,L.S. (2001): The yeast recombinational repair protein Rad59 interacts with Rad52 and stimulates single-strand annealing. *Genetics*, 159:515-525.
- de Boer,J. and Hoeijmakers,J.H. (2000): Nucleotide excision repair and human syndromes. *Carcinogenesis*, 21:453-460.
- de Jager,M., van Noort,J., van Gent,D.C., Dekker,C., Kanaar,R., and Wyman,C. (2001): Human Rad50/Mre11 is a flexible complex that can tether DNA ends. *Mol.Cell*, 8:1129-1135.
- Deckbar,D., Birraux,J., Krempler,A., Tchouandong,L., Beucher,A., Walker,S., Stiff,T., Jeggo,P., and Lobrich,M. (2007): Chromosome breakage after G2 checkpoint release. *J.Cell Biol.*, 176:749-755.
- Dedon,P.C. and Goldberg,I.H. (1992): Influence of thiol structure on neocarzinostatin activation and expression of DNA damage. *Biochemistry*, 31:1909-1917.
- Degrassi,F., Fiore,M., and Palitti,F. (2004): Chromosomal aberrations and genomic instability induced by topoisomerase-targeted antitumour drugs. *Curr.Med.Chem.Anticancer Agents*, 4:317-325.
- Despras,E., Pfeiffer,P., Salles,B., Calsou,P., Kuhfittig-Kulle,S., Angulo,J.F., and Biard,D.S. (2007): Long-term XPC silencing reduces DNA double-strand break repair. *Cancer Res.*, 67:2526-2534.
- DiBiase,S.J., Zeng,Z.C., Chen,R., Hyslop,T., Curran,W.J., Jr., and Iliakis,G. (2000): DNA-dependent protein kinase stimulates an independently active, nonhomologous, end-joining apparatus. *Cancer Res.*, 60:1245-1253.
- Dimitrova,N. and de Lange,T. (2006): MDC1 accelerates nonhomologous end-joining of dysfunctional telomeres. *Genes Dev.*, 20:3238-3243.
- Ding,Q., Reddy,Y.V., Wang,W., Woods,T., Douglas,P., Ramsden,D.A., Lees-Miller,S.P., and Meek,K. (2003): Autophosphorylation of the catalytic subunit of the DNA-dependent protein kinase is required for efficient end processing during DNA double-strand break repair. *Mol.Cell Biol.*, 23:5836-5848.
- DiTullio,R.A., Jr., Mochan,T.A., Venere,M., Bartkova,J., Sehested,M., Bartek,J., and Halazonetis,T.D. (2002): 53BP1 functions in an ATM-dependent checkpoint pathway that is constitutively activated in human cancer. *Nat.Cell Biol.*, 4:998-1002.

6. Literaturverzeichnis

- Dominguez-Bendala,J., Masutani,M., and McWhir,J. (2006): Down-regulation of PARP-1, but not of Ku80 or DNA-PKcs', results in higher gene targeting efficiency. *Cell Biol.Int.*, 30:389-393.
- Dong,Z., Zhong,Q., and Chen,P.L. (1999): The Nijmegen breakage syndrome protein is essential for Mre11 phosphorylation upon DNA damage. *J.Biol.Chem.*, 274:19513-19516.
- Drew,Y. and Calvert,H. (2008): The potential of PARP inhibitors in genetic breast and ovarian cancers. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, 1138:136-145.
- Eisenbrand,G., Hippe,F., Jakobs,S., and Muehlbeyer,S. (2004): Molecular mechanisms of indirubin and its derivatives: novel anticancer molecules with their origin in traditional Chinese phytomedicine. *J.Cancer Res.Clin.Oncol.*, 130:627-635.
- Eliezer,Y., Argaman,L., Rhie,A., Doherty,A.J., and Goldberg,M. (2009): The direct interaction between 53BP1 and MDC1 is required for the recruitment of 53BP1 to sites of damage. *J.Biol.Chem.*, 284:426-435.
- Ellenberger,T. and Tomkinson,A.E. (2008): Eukaryotic DNA ligases: structural and functional insights. *Annu.Rev.Biochem.*, 77:313-338.
- Esashi,F., Christ,N., Gannon,J., Liu,Y., Hunt,T., Jasin,M., and West,S.C. (2005): CDK-dependent phosphorylation of BRCA2 as a regulatory mechanism for recombinational repair. *Nature*, 434:598-604.
- Essers,J., Hendriks,R.W., Swagemakers,S.M., Troelstra,C., de Wit,J., Bootsma,D., Hoeijmakers,J.H., and Kanaar,R. (1997): Disruption of mouse RAD54 reduces ionizing radiation resistance and homologous recombination. *Cell*, 89:195-204.
- Essers,J., van Steeg,H., de Wit,J., Swagemakers,S.M., Vermeij,M., Hoeijmakers,J.H., and Kanaar,R. (2000): Homologous and non-homologous recombination differentially affect DNA damage repair in mice. *EMBO J.*, 19:1703-1710.
- Fairbairn,D.W., Olive,P.L., and O'Neill,K.L. (1995): The comet assay: a comprehensive review. *Mutat.Res.*, 339:37-59.
- Falck,J., Mailand,N., Syljuasen,R.G., Bartek,J., and Lukas,J. (2001): The ATM-Chk2-Cdc25A checkpoint pathway guards against radioresistant DNA synthesis. *Nature*, 410:842-847.
- Falck,J., Petrini,J.H., Williams,B.R., Lukas,J., and Bartek,J. (2002): The DNA damage-dependent intra-S phase checkpoint is regulated by parallel pathways. *Nat.Genet.*, 30:290-294.
- Fernandez-Capetillo,O., Mahadevaiah,S.K., Celeste,A., Romanienko,P.J., Camerini-Otero,R.D., Bonner,W.M., Manova,K., Burgoyne,P., and Nussenzweig,A. (2003): H2AX is required for chromatin remodeling and inactivation of sex chromosomes in male mouse meiosis. *Dev.Cell*, 4:497-508.
- Fernandez-Capetillo,O., Lee,A., Nussenzweig,M., and Nussenzweig,A. (2004): H2AX: the histone guardian of the genome. *DNA Repair (Amst)*, 3:959-967.

6. Literaturverzeichnis

- Fernandez-Capetillo, O. and Nussenzweig, A. (2008): ATM breaks into heterochromatin. *Mol. Cell*, 31:303-304.
- Fishman-Lobell, J., Rudin, N., and Haber, J.E. (1992): Two alternative pathways of double-strand break repair that are kinetically separable and independently modulated. *Mol. Cell Biol.*, 12:1292-1303.
- Franchitto, A., Pichierri, P., Piergentili, R., Crescenzi, M., Bignami, M., and Palitti, F. (2003): The mammalian mismatch repair protein MSH2 is required for correct MRE11 and RAD51 relocalization and for efficient cell cycle arrest induced by ionizing radiation in G2 phase. *Oncogene*, 22:2110-2120.
- Franco, S., Gostissa, M., Zha, S., Lombard, D.B., Murphy, M.M., Zarrin, A.A., Yan, C., Tepsuporn, S., Morales, J.C., Adams, M.M., Lou, Z., Bassing, C.H., Manis, J.P., Chen, J., Carpenter, P.B., and Alt, F.W. (2006): H2AX prevents DNA breaks from progressing to chromosome breaks and translocations. *Mol. Cell*, 21:201-214.
- Friedberg, E.C., Bardwell, A.J., Bardwell, L., Feaver, W.J., Kornberg, R.D., Svejstrup, J.Q., Tomkinson, A.E., and Wang, Z. (1995): Nucleotide excision repair in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: its relationship to specialized mitotic recombination and RNA polymerase II basal transcription. *Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci.*, 347:63-68.
- Friedberg, E.C., Aguilera, A., Gellert, M., Hanawalt, P.C., Hays, J.B., Lehmann, A.R., Lindahl, T., Lowndes, N., Sarasin, A., and Wood, R.D. (2006): DNA repair: from molecular mechanism to human disease. *DNA Repair (Amst)*, 5:986-996.
- Gao, Y., Chaudhuri, J., Zhu, C., Davidson, L., Weaver, D.T., and Alt, F.W. (1998): A targeted DNA-PKcs-null mutation reveals DNA-PK-independent functions for KU in V(D)J recombination. *Immunity*, 9:367-376.
- Gatei, M., Young, D., Cerosaletti, K.M., Desai-Mehta, A., Spring, K., Kozlov, S., Lavin, M.F., Gatti, R.A., Concannon, P., and Khanna, K. (2000): ATM-dependent phosphorylation of nibrin in response to radiation exposure. *Nat. Genet.*, 25:115-119.
- Getts, R.C. and Stamato, T.D. (1994): Absence of a Ku-like DNA end binding activity in the xrs double-strand DNA repair-deficient mutant. *J. Biol. Chem.*, 269:15981-15984.
- Goldberg, M., Stucki, M., Falck, J., D'Amours, D., Rahman, D., Pappin, D., Bartek, J., and Jackson, S.P. (2003): MDC1 is required for the intra-S-phase DNA damage checkpoint. *Nature*, 421:952-956.
- Golding, S.E., Rosenberg, E., Khalil, A., McEwen, A., Holmes, M., Neill, S., Povirk, L.F., and Valerie, K. (2004): Double strand break repair by homologous recombination is regulated by cell cycle-independent signaling via ATM in human glioma cells. *J. Biol. Chem.*, 279:15402-15410.
- Golub, E.I., Kovalenko, O.V., Gupta, R.C., Ward, D.C., and Radding, C.M. (1997): Interaction of human recombination proteins Rad51 and Rad54. *Nucleic Acids Res.*, 25:4106-4110.

6. Literaturverzeichnis

- Goodarzi,A.A., Yu,Y., Riballo,E., Douglas,P., Walker,S.A., Ye,R., Harer,C., Marchetti,C., Morrice,N., Jeggo,P.A., and Lees-Miller,S.P. (2006): DNA-PK autophosphorylation facilitates Artemis endonuclease activity. *EMBO J.*, 25:3880-3889.
- Goodarzi,A.A., Noon,A.T., Deckbar,D., Ziv,Y., Shiloh,Y., Lobrich,M., and Jeggo,P.A. (2008): ATM signaling facilitates repair of DNA double-strand breaks associated with heterochromatin. *Mol.Cell*, 31:167-177.
- Goodarzi,A.A., Noon,A.T., and Jeggo,P.A. (2009): The impact of heterochromatin on DSB repair. *Biochem.Soc.Trans.*, 37:569-576.
- Gottlieb,T.M. and Jackson,S.P. (1993): The DNA-dependent protein kinase: requirement for DNA ends and association with Ku antigen. *Cell*, 72:131-142.
- Gravel,S. and Wellinger,R.J. (2002): Maintenance of double-stranded telomeric repeats as the critical determinant for cell viability in yeast cells lacking Ku. *Mol.Cell Biol.*, 22:2182-2193.
- Grawunder,U., Wilm,M., Wu,X., Kulesza,P., Wilson,T.E., Mann,M., and Lieber,M.R. (1997): Activity of DNA ligase IV stimulated by complex formation with XRCC4 protein in mammalian cells. *Nature*, 388:492-495.
- Grudzenski,S., Kuefner,M.A., Heckmann,M.B., Uder,M., and Lobrich,M. (2009): Contrast medium-enhanced radiation damage caused by CT examinations. *Radiology*, 253:706-714.
- Gu,J., Lu,H., Tippin,B., Shimazaki,N., Goodman,M.F., and Lieber,M.R. (2007): XRCC4:DNA ligase IV can ligate incompatible DNA ends and can ligate across gaps. *EMBO J.*, 26:1010-1023.
- Gupta,R.C., Bazemore,L.R., Golub,E.I., and Radding,C.M. (1997): Activities of human recombination protein Rad51. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 94:463-468.
- Haber,J.E. (2000): Partners and pathways repairing a double-strand break. *Trends Genet.*, 16:259-264.
- Hall,E.J. (2000): Radiation, the two-edged sword: cancer risks at high and low doses. *Cancer J.*, 6:343-350.
- Hammond,S.M., Bernstein,E., Beach,D., and Hannon,G.J. (2000): An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature*, 404:293-296.
- Hartley,K.O., Gell,D., Smith,G.C., Zhang,H., Divecha,N., Connelly,M.A., Admon,A., Lees-Miller,S.P., Anderson,C.W., and Jackson,S.P. (1995): DNA-dependent protein kinase catalytic subunit: a relative of phosphatidylinositol 3-kinase and the ataxia telangiectasia gene product. *Cell*, 82:849-856.
- Hefferin,M.L. and Tomkinson,A.E. (2005): Mechanism of DNA double-strand break repair by non-homologous end joining. *DNA Repair (Amst)*, 4:639-648.
- Hendzel,M.J., Wei,Y., Mancini,M.A., Van Hooser,A., Ranalli,T., Brinkley,B.R., Bazett-Jones,D.P., and Allis,C.D. (1997): Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in

6. Literaturverzeichnis

- an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation. *Chromosoma*, 106:348-360.
- Henner,W.D., Grunberg,S.M., and Haseltine,W.A. (1983): Enzyme action at 3' termini of ionizing radiation-induced DNA strand breaks. *J.Biol.Chem.*, 258:15198-15205.
- Heyer,W.D., Li,X., Rolfsmeier,M., and Zhang,X.P. (2006): Rad54: the Swiss Army knife of homologous recombination? *Nucleic Acids Res.*, 34:4115-4125.
- Hickson,I., Zhao,Y., Richardson,C.J., Green,S.J., Martin,N.M., Orr,A.I., Reaper,P.M., Jackson,S.P., Curtin,N.J., and Smith,G.C. (2004): Identification and characterization of a novel and specific inhibitor of the ataxia-telangiectasia mutated kinase ATM. *Cancer Res.*, 64:9152-9159.
- Hinz,J.M., Yamada,N.A., Salazar,E.P., Tebbs,R.S., and Thompson,L.H. (2005): Influence of double-strand-break repair pathways on radiosensitivity throughout the cell cycle in CHO cells. *DNA Repair (Amst)*, 4:782-792.
- Hiom,K. (1999): Dna repair: Rad52 - the means to an end. *Curr.Biol.*, 9:R446-R448
- Hochegger,H., Dejsuphong,D., Fukushima,T., Morrison,C., Sonoda,E., Schreiber,V., Zhao,G.Y., Saberi,A., Masutani,M., Adachi,N., Koyama,H., de Murcia,G., and Takeda,S. (2006): Parp-1 protects homologous recombination from interference by Ku and Ligase IV in vertebrate cells. *EMBO J.*, 25:1305-1314.
- Hoeijmakers,J.H. (2001): Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*, 411:366-374.
- Hoeijmakers,J.H. (2001): DNA repair mechanisms. *Maturitas*, 38:17-22.
- Holliday,R. (1964): THE INDUCTION OF MITOTIC RECOMBINATION BY MITOMYCIN C IN USTILAGO AND SACCHAROMYCES. *Genetics*, 50:323-335.
- Holliday,R. and Ho,T. (2002): DNA methylation and epigenetic inheritance. *Methods*, 27:179-183.
- Hopfner,K.P., Craig,L., Moncalian,G., Zinkel,R.A., Usui,T., Owen,B.A., Karcher,A., Henderson,B., Bodmer,J.L., McMurray,C.T., Carney,J.P., Petrini,J.H., and Tainer,J.A. (2002): The Rad50 zinc-hook is a structure joining Mre11 complexes in DNA recombination and repair. *Nature*, 418:562-566.
- Huen,M.S., Grant,R., Manke,I., Minn,K., Yu,X., Yaffe,M.B., and Chen,J. (2007): RNF8 transduces the DNA-damage signal via histone ubiquitylation and checkpoint protein assembly. *Cell*, 131:901-914.
- Hurley,P.J. and Bunz,F. (2007): ATM and ATR: components of an integrated circuit. *Cell Cycle*, 6:414-417.
- Iijima,K., Ohara,M., Seki,R., and Tauchi,H. (2008): Dancing on damaged chromatin: functions of ATM and the RAD50/MRE11/NBS1 complex in cellular responses to DNA damage. *J.Radiat.Res.(Tokyo)*, 49:451-464.

6. Literaturverzeichnis

- Ikura,T., Tashiro,S., Kakino,A., Shima,H., Jacob,N., Amunugama,R., Yoder,K., Izumi,S., Kuraoka,I., Tanaka,K., Kimura,H., Ikura,M., Nishikubo,S., Ito,T., Muto,A., Miyagawa,K., Takeda,S., Fishel,R., Igarashi,K., and Kamiya,K. (2007): DNA damage-dependent acetylation and ubiquitination of H2AX enhances chromatin dynamics. *Mol.Cell Biol.*, 27:7028-7040.
- Iliakis,G., Wang,Y., Guan,J., and Wang,H. (2003): DNA damage checkpoint control in cells exposed to ionizing radiation. *Oncogene*, 22:5834-5847.
- Iliakis,G., Wang,H., Perrault,A.R., Boecker,W., Rosidi,B., Windhofer,F., Wu,W., Guan,J., Terzoudi,G., and Pantelias,G. (2004): Mechanisms of DNA double strand break repair and chromosome aberration formation. *Cytogenet.Genome Res.*, 104:14-20.
- Ira,G., Pelliccioli,A., Balijja,A., Wang,X., Fiorani,S., Carotenuto,W., Liberi,G., Bressan,D., Wan,L., Hollingsworth,N.M., Haber,J.E., and Foiani,M. (2004): DNA end resection, homologous recombination and DNA damage checkpoint activation require CDK1. *Nature*, 431:1011-1017.
- Ismail,I.H. and Hendzel,M.J. (2008): The gamma-H2A.X: is it just a surrogate marker of double-strand breaks or much more? *Environ.Mol.Mutagen.*, 49:73-82.
- Ivanov,E.L., Sugawara,N., Fishman-Lobell,J., and Haber,J.E. (1996): Genetic requirements for the single-strand annealing pathway of double-strand break repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 142:693-704.
- Jacobs,J.P., Jones,C.M., and Baille,J.P. (1970): Characteristics of a human diploid cell designated MRC-5. *Nature*, 227:168-170.
- Javaheri,A., Wysocki,R., Jobin-Robitaille,O., Altaf,M., Cote,J., and Kron,S.J. (2006): Yeast G1 DNA damage checkpoint regulation by H2A phosphorylation is independent of chromatin remodeling. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 103:13771-13776.
- Jeggo,P.A., Hafezparast,M., Thompson,A.F., Broughton,B.C., Kaur,G.P., Zdzienicka,M.Z., and Athwal,R.S. (1992): Localization of a DNA repair gene (XRCC5) involved in double-strand-break rejoining to human chromosome 2. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 89:6423-6427.
- Jhappan,C., Morse,H.C., III, Fleischmann,R.D., Gottesman,M.M., and Merlino,G. (1997): DNA-PKcs: a T-cell tumour suppressor encoded at the mouse scid locus. *Nat.Genet.*, 17:483-486.
- Jiang,H., Xie,Y., Houston,P., Stemke-Hale,K., Mortensen,U.H., Rothstein,R., and Kodadek,T. (1996): Direct association between the yeast Rad51 and Rad54 recombination proteins. *J.Biol.Chem.*, 271:33181-33186.
- Johnson,R.D. and Jasin,M. (2000): Sister chromatid gene conversion is a prominent double-strand break repair pathway in mammalian cells. *EMBO J.*, 19:3398-3407.
- Johnson,R.D. and Jasin,M. (2001): Double-strand-break-induced homologous recombination in mammalian cells. *Biochem.Soc.Trans.*, 29:196-201.
- Kampinga,H.H., Waarde-Verhagen,M.A., Assen-Bolt,A.J., Nieuwenhuis,B., Rodemann,H.P., Prowse,K.R., and Linskens,M.H. (2004): Reconstitution of active telomerase in

6. Literaturverzeichnis

- primary human foreskin fibroblasts: effects on proliferative characteristics and response to ionizing radiation. *Int.J.Radiat.Biol.*, 80:377-388.
- Kanaar,R. and Hoeijmakers,J.H. (1998): Genetic recombination. From competition to collaboration. *Nature*, 391:335, 337-335, 338.
- Karran,P. (2000): DNA double strand break repair in mammalian cells. *Curr.Opin.Genet.Dev.*, 10:144-150.
- Kegel,P., Riballo,E., Kuhne,M., Jeggo,P.A., and Lobrich,M. (2007): X-irradiation of cells on glass slides has a dose doubling impact. *DNA Repair (Amst)*, 6:1692-1697.
- Khanna,K.K., Keating,K.E., Kozlov,S., Scott,S., Gatei,M., Hobson,K., Taya,Y., Gabrielli,B., Chan,D., Lees-Miller,S.P., and Lavin,M.F. (1998): ATM associates with and phosphorylates p53: mapping the region of interaction. *Nat.Genet.*, 20:398-400.
- Khanna,K.K. and Jackson,S.P. (2001): DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat.Genet.*, 27:247-254.
- Khanna,K.K. and Jackson,S.P. (2001): DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat.Genet.*, 27:247-254.
- Kim,H., Chen,J., and Yu,X. (2007): Ubiquitin-binding protein RAP80 mediates BRCA1-dependent DNA damage response. *Science*, 316:1202-1205.
- Kim,J.S., Krasieva,T.B., Kurumizaka,H., Chen,D.J., Taylor,A.M., and Yokomori,K. (2005): Independent and sequential recruitment of NHEJ and HR factors to DNA damage sites in mammalian cells. *J.Cell Biol.*, 170:341-347.
- Kim,S.H., Kaminker,P., and Campisi,J. (1999): TIN2, a new regulator of telomere length in human cells. *Nat.Genet.*, 23:405-412.
- Kim,S.T., Xu,B., and Kastan,M.B. (2002): Involvement of the cohesin protein, Smc1, in Atm-dependent and independent responses to DNA damage. *Genes Dev.*, 16:560-570.
- King,M.C., Marks,J.H., and Mandell,J.B. (2003): Breast and ovarian cancer risks due to inherited mutations in BRCA1 and BRCA2. *Science*, 302:643-646.
- Kinner,A., Wu,W., Staudt,C., and Iliakis,G. (2008): Gamma-H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin. *Nucleic Acids Res.*, 36:5678-5694.
- Kinzler,K.W. and Vogelstein,B. (1997): Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers. *Nature*, 386:761, 763.
- Kobayashi,J., Iwabuchi,K., Miyagawa,K., Sonoda,E., Suzuki,K., Takata,M., and Tauchi,H. (2008): Current topics in DNA double-strand break repair. *J.Radiat.Res.(Tokyo)*, 49:93-103.
- Koch,C.A., Agyei,R., Galicia,S., Metalnikov,P., O'Donnell,P., Starostine,A., Weinfeld,M., and Durocher,D. (2004): Xrcc4 physically links DNA end processing by polynucleotide kinase to DNA ligation by DNA ligase IV. *EMBO J.*, 23:3874-3885.

6. Literaturverzeichnis

- Koch,C.A., Agyei,R., Galicia,S., Metalnikov,P., O'Donnell,P., Starostine,A., Weinfeld,M., and Durocher,D. (2004): Xrcc4 physically links DNA end processing by polynucleotide kinase to DNA ligation by DNA ligase IV. *EMBO J.*, 23:3874-3885.
- Kolas,N.K., Chapman,J.R., Nakada,S., Ylanko,J., Chahwan,R., Sweeney,F.D., Panier,S., Mendez,M., Wildenhain,J., Thomson,T.M., Pelletier,L., Jackson,S.P., and Durocher,D. (2007): Orchestration of the DNA-damage response by the RNF8 ubiquitin ligase. *Science*, 318:1637-1640.
- Kruhlak,M.J., Celeste,A., Dellaire,G., Fernandez-Capetillo,O., Muller,W.G., McNally,J.G., Bazett-Jones,D.P., and Nussenzweig,A. (2006): Changes in chromatin structure and mobility in living cells at sites of DNA double-strand breaks. *J.Cell Biol.*, 172:823-834.
- Kuefner,M.A., Grudzenski,S., Schwab,S.A., Wiederseiner,M., Heckmann,M., Bautz,W., Lobrich,M., and Uder,M. (2009): DNA double-strand breaks and their repair in blood lymphocytes of patients undergoing angiographic procedures. *Invest Radiol.*, 44:440-446.
- Kuhne,M., Riballo,E., Rief,N., Rothkamm,K., Jeggo,P.A., and Lobrich,M. (2004): A double-strand break repair defect in ATM-deficient cells contributes to radiosensitivity. *Cancer Res.*, 64:500-508.
- Kurimasa,A., Kumano,S., Boubnov,N.V., Story,M.D., Tung,C.S., Peterson,S.R., and Chen,D.J. (1999): Requirement for the kinase activity of human DNA-dependent protein kinase catalytic subunit in DNA strand break rejoining. *Mol.Cell Biol.*, 19:3877-3884.
- Kurose,A., Tanaka,T., Huang,X., Traganos,F., and Darzynkiewicz,Z. (2006): Synchronization in the cell cycle by inhibitors of DNA replication induces histone H2AX phosphorylation: an indication of DNA damage. *Cell Prolif.*, 39:231-240.
- Labhart,P. (1999): Ku-dependent nonhomologous DNA end joining in *Xenopus* egg extracts. *Mol.Cell Biol.*, 19:2585-2593.
- Leber,R., Wise,T.W., Mizuta,R., and Meek,K. (1998): The XRCC4 gene product is a target for and interacts with the DNA-dependent protein kinase. *J.Biol.Chem.*, 273:1794-1801.
- Lee,J.H. and Paull,T.T. (2007): Activation and regulation of ATM kinase activity in response to DNA double-strand breaks. *Oncogene*, 26:7741-7748.
- Lee,K.J., Huang,J., Takeda,Y., and Dynan,W.S. (2000): DNA ligase IV and XRCC4 form a stable mixed tetramer that functions synergistically with other repair factors in a cell-free end-joining system. *J.Biol.Chem.*, 275:34787-34796.
- Lees-Miller,S.P., Chen,Y.R., and Anderson,C.W. (1990): Human cells contain a DNA-activated protein kinase that phosphorylates simian virus 40 T antigen, mouse p53, and the human Ku autoantigen. *Mol.Cell Biol.*, 10:6472-6481.
- Lengauer,C., Kinzler,K.W., and Vogelstein,B. (1998): Genetic instabilities in human cancers. *Nature*, 396:643-649.

6. Literaturverzeichnis

- Leppard,J.B., Dong,Z., Mackey,Z.B., and Tomkinson,A.E. (2003): Physical and functional interaction between DNA ligase III α and poly(ADP-Ribose) polymerase 1 in DNA single-strand break repair. *Mol.Cell Biol.*, 23:5919-5927.
- Leuschner,P.J., Ameres,S.L., Kueng,S., and Martinez,J. (2006): Cleavage of the siRNA passenger strand during RISC assembly in human cells. *EMBO Rep.*, 7:314-320.
- Li,B., Navarro,S., Kasahara,N., and Comai,L. (2004): Identification and biochemical characterization of a Werner's syndrome protein complex with Ku70/80 and poly(ADP-ribose) polymerase-1. *J.Biol.Chem.*, 279:13659-13667.
- Li,J., Read,L.R., and Baker,M.D. (2001): The mechanism of mammalian gene replacement is consistent with the formation of long regions of heteroduplex DNA associated with two crossing-over events. *Mol.Cell Biol.*, 21:501-510.
- Li,X., Lee,Y.K., Jeng,J.C., Yen,Y., Schultz,D.C., Shih,H.M., and Ann,D.K. (2007): Role for KAP1 serine 824 phosphorylation and sumoylation/desumoylation switch in regulating KAP1-mediated transcriptional repression. *J.Biol.Chem.*, 282:36177-36189.
- Liang,L., Deng,L., Chen,Y., Li,G.C., Shao,C., and Tischfield,J.A. (2005): Modulation of DNA end joining by nuclear proteins. *J.Biol.Chem.*, 280:31442-31449.
- Liao,H., Winkfein,R.J., Mack,G., Rattner,J.B., and Yen,T.J. (1995): CENP-F is a protein of the nuclear matrix that assembles onto kinetochores at late G2 and is rapidly degraded after mitosis. *J.Cell Biol.*, 130:507-518.
- Lieber,M.R., Ma,Y., Pannicke,U., and Schwarz,K. (2004): The mechanism of vertebrate nonhomologous DNA end joining and its role in V(D)J recombination. *DNA Repair (Amst)*, 3:817-826.
- Lim,D.S. and Hasty,P. (1996): A mutation in mouse rad51 results in an early embryonic lethal that is suppressed by a mutation in p53. *Mol.Cell Biol.*, 16:7133-7143.
- Lin,F.L., Sperle,K., and Sternberg,N. (1984): Model for homologous recombination during transfer of DNA into mouse L cells: role for DNA ends in the recombination process. *Mol.Cell Biol.*, 4:1020-1034.
- Liu,N., Lamerdin,J.E., Tebbs,R.S., Schild,D., Tucker,J.D., Shen,M.R., Brookman,K.W., Siciliano,M.J., Walter,C.A., Fan,W., Narayana,L.S., Zhou,Z.Q., Adamson,A.W., Sorensen,K.J., Chen,D.J., Jones,N.J., and Thompson,L.H. (1998): XRCC2 and XRCC3, new human Rad51-family members, promote chromosome stability and protect against DNA cross-links and other damages. *Mol.Cell*, 1:783-793.
- Liu,N., Lamerdin,J.E., Tebbs,R.S., Schild,D., Tucker,J.D., Shen,M.R., Brookman,K.W., Siciliano,M.J., Walter,C.A., Fan,W., Narayana,L.S., Zhou,Z.Q., Adamson,A.W., Sorensen,K.J., Chen,D.J., Jones,N.J., and Thompson,L.H. (1998): XRCC2 and XRCC3, new human Rad51-family members, promote chromosome stability and protect against DNA cross-links and other damages. *Mol.Cell*, 1:783-793.

6. Literaturverzeichnis

- Liu,N. (2002): XRCC2 is Required for the Formation of Rad51 Foci Induced by Ionizing Radiation and DNA Cross-Linking Agent Mitomycin C. *J.Biomed.Biotechnol.*, 2:106-113.
- Liu,Z., Wu,J., and Yu,X. (2007): CCDC98 targets BRCA1 to DNA damage sites. *Nat.Struct.Mol.Biol.*, 14:716-720.
- Lobrich,M., Rydberg,B., and Cooper,P.K. (1995): Repair of x-ray-induced DNA double-strand breaks in specific Not I restriction fragments in human fibroblasts: joining of correct and incorrect ends. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 92:12050-12054.
- Lobrich,M., Rief,N., Kuhne,M., Heckmann,M., Fleckenstein,J., Rube,C., and Uder,M. (2005): In vivo formation and repair of DNA double-strand breaks after computed tomography examinations. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 102:8984-8989.
- Lobrich,M. and Kiefer,J. (2006): Assessing the likelihood of severe side effects in radiotherapy. *Int.J.Cancer*, 118:2652-2656.
- Loeb,L.A. and Preston,B.D. (1986): Mutagenesis by apurinic/apyrimidinic sites. *Annu.Rev.Genet.*, 20:201-230.
- Lou,Z., Minter-Dykhouse,K., Wu,X., and Chen,J. (2003): MDC1 is coupled to activated CHK2 in mammalian DNA damage response pathways. *Nature*, 421:957-961.
- Lou,Z., Chen,B.P., Asaithamby,A., Minter-Dykhouse,K., Chen,D.J., and Chen,J. (2004): MDC1 regulates DNA-PK autophosphorylation in response to DNA damage. *J.Biol.Chem.*, 279:46359-46362.
- Lou,Z., Minter-Dykhouse,K., Franco,S., Gostissa,M., Rivera,M.A., Celeste,A., Manis,J.P., van Deursen,J., Nussenzweig,A., Paull,T.T., Alt,F.W., and Chen,J. (2006): MDC1 maintains genomic stability by participating in the amplification of ATM-dependent DNA damage signals. *Mol.Cell*, 21:187-200.
- Lou,Z., Minter-Dykhouse,K., Franco,S., Gostissa,M., Rivera,M.A., Celeste,A., Manis,J.P., van Deursen,J., Nussenzweig,A., Paull,T.T., Alt,F.W., and Chen,J. (2006): MDC1 maintains genomic stability by participating in the amplification of ATM-dependent DNA damage signals. *Mol.Cell*, 21:187-200.
- Ma,Y., Pannicke,U., Schwarz,K., and Lieber,M.R. (2002): Hairpin opening and overhang processing by an Artemis/DNA-dependent protein kinase complex in nonhomologous end joining and V(D)J recombination. *Cell*, 108:781-794.
- Ma,Y., Schwarz,K., and Lieber,M.R. (2005): The Artemis:DNA-PKcs endonuclease cleaves DNA loops, flaps, and gaps. *DNA Repair (Amst)*, 4:845-851.
- Mahrhofer,H., Burger,S., Oppitz,U., Flentje,M., and Djuzenova,C.S. (2006): Radiation induced DNA damage and damage repair in human tumor and fibroblast cell lines assessed by histone H2AX phosphorylation. *Int.J.Radiat.Oncol.Biol.Phys.*, 64:573-580.
- Mailand,N., Bekker-Jensen,S., Faustrup,H., Melander,F., Bartek,J., Lukas,C., and Lukas,J. (2007): RNF8 ubiquitylates histones at DNA double-strand breaks and promotes assembly of repair proteins. *Cell*, 131:887-900.

6. Literaturverzeichnis

- Malumbres,M. and Barbacid,M. (2001): To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nat.Rev.Cancer*, 1:222-231.
- Manis,J.P., Dudley,D., Kaylor,L., and Alt,F.W. (2002): IgH class switch recombination to IgG1 in DNA-PKcs-deficient B cells. *Immunity*, 16:607-617.
- Manis,J.P., Morales,J.C., Xia,Z., Kutok,J.L., Alt,F.W., and Carpenter,P.B. (2004): 53BP1 links DNA damage-response pathways to immunoglobulin heavy chain class-switch recombination. *Nat.Immunol.*, 5:481-487.
- Mannironi,C., Bonner,W.M., and Hatch,C.L. (1989): H2A.X. a histone isoprotein with a conserved C-terminal sequence, is encoded by a novel mRNA with both DNA replication type and polyA 3' processing signals. *Nucleic Acids Res.*, 17:9113-9126.
- Mansour,W.Y., Schumacher,S., Roskopf,R., Rhein,T., Schmidt-Petersen,F., Gatzemeier,F., Haag,F., Borgmann,K., Willers,H., and Dahm-Daphi,J. (2008): Hierarchy of nonhomologous end-joining, single-strand annealing and gene conversion at site-directed DNA double-strand breaks. *Nucleic Acids Res.*, 36:4088-4098.
- Mao,Z., Bozzella,M., Seluanov,A., and Gorbunova,V. (2008): DNA repair by nonhomologous end joining and homologous recombination during cell cycle in human cells. *Cell Cycle*, 7:2902-2906.
- Marcus Winter. Zelluläre und molekularbiologische Grundlagen der vorzeitigen Alterung humaner Fibroblasten nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen und Kohlenstoff-Ionen. Ref Type: Thesis/Dissertation
- Matsuoka,S., Ballif,B.A., Smogorzewska,A., McDonald,E.R., III, Hurov,K.E., Luo,J., Bakalarski,C.E., Zhao,Z., Solimini,N., Lerenthal,Y., Shiloh,Y., Gygi,S.P., and Elledge,S.J. (2007): ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science*, 316:1160-1166.
- Mazin,A.V., Bornarth,C.J., Solinger,J.A., Heyer,W.D., and Kowalczykowski,S.C. (2000): Rad54 protein is targeted to pairing loci by the Rad51 nucleoprotein filament. *Mol.Cell*, 6:583-592.
- Mazin,A.V., Alexeev,A.A., and Kowalczykowski,S.C. (2003): A novel function of Rad54 protein. Stabilization of the Rad51 nucleoprotein filament. *J.Biol.Chem.*, 278:14029-14036.
- McElhinny,A.S., Schwach,C., Valichnac,M., Mount-Patrick,S., and Gregorio,C.C. (2005): Nebulin regulates the assembly and lengths of the thin filaments in striated muscle. *J.Cell Biol.*, 170:947-957.
- Merrick,C.J., Jackson,D., and Diffley,J.F. (2004): Visualization of altered replication dynamics after DNA damage in human cells. *J.Biol.Chem.*, 279:20067-20075.
- Mimori,T. and Hardin,J.A. (1986): Mechanism of interaction between Ku protein and DNA. *J.Biol.Chem.*, 261:10375-10379.
- Minter-Dykhouse,K., Ward,I., Huen,M.S., Chen,J., and Lou,Z. (2008): Distinct versus overlapping functions of MDC1 and 53BP1 in DNA damage response and tumorigenesis. *J.Cell Biol.*, 181:727-735.

6. Literaturverzeichnis

- Mochan,T.A., Venere,M., DiTullio,R.A., Jr., and Halazonetis,T.D. (2003): 53BP1 and NFB1/MDC1-Nbs1 function in parallel interacting pathways activating ataxia-telangiectasia mutated (ATM) in response to DNA damage. *Cancer Res.*, 63:8586-8591.
- Modesti,M. and Kanaar,R. (2001): Homologous recombination: from model organisms to human disease. *Genome Biol.*, 2:REVIEWS1014
- Moreno-Herrero,F., de Jager,M., Dekker,N.H., Kanaar,R., Wyman,C., and Dekker,C. (2005): Mesoscale conformational changes in the DNA-repair complex Rad50/Mre11/Nbs1 upon binding DNA. *Nature*, 437:440-443.
- Morrison,C., Sonoda,E., Takao,N., Shinohara,A., Yamamoto,K., and Takeda,S. (2000): The controlling role of ATM in homologous recombinational repair of DNA damage. *EMBO J.*, 19:463-471.
- Mortensen,U.H., Bendixen,C., Sunjevaric,I., and Rothstein,R. (1996): DNA strand annealing is promoted by the yeast Rad52 protein. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 93:10729-10734.
- Moshous,D., Callebaut,I., de Chasseval,R., Corneo,B., Cavazzana-Calvo,M., le Deist,F., Tezcan,I., Sanal,O., Bertrand,Y., Philippe,N., Fischer,A., and de Villartay,J.P. (2001): Artemis, a novel DNA double-strand break repair/V(D)J recombination protein, is mutated in human severe combined immune deficiency. *Cell*, 105:177-186.
- Moynahan,M.E. and Jasin,M. (1997): Loss of heterozygosity induced by a chromosomal double-strand break. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 94:8988-8993.
- Moynahan,M.E., Chiu,J.W., Koller,B.H., and Jasin,M. (1999): Brca1 controls homology-directed DNA repair. *Mol.Cell*, 4:511-518.
- Moynahan,M.E., Pierce,A.J., and Jasin,M. (2001): BRCA2 is required for homology-directed repair of chromosomal breaks. *Mol.Cell*, 7:263-272.
- Nick McElhinny,S.A., Snowden,C.M., McCarville,J., and Ramsden,D.A. (2000): Ku recruits the XRCC4-ligase IV complex to DNA ends. *Mol.Cell Biol.*, 20:2996-3003.
- Niida,H. and Nakanishi,M. (2006): DNA damage checkpoints in mammals. *Mutagenesis*, 21:3-9.
- Nimonkar,A.V., Ozsoy,A.Z., Genschel,J., Modrich,P., and Kowalczykowski,S.C. (2008): Human exonuclease 1 and BLM helicase interact to resect DNA and initiate DNA repair. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 105:16906-16911.
- O'Driscoll,M., Cerosaletti,K.M., Girard,P.M., Dai,Y., Stumm,M., Kysela,B., Hirsch,B., Gennery,A., Palmer,S.E., Seidel,J., Gatti,R.A., Varon,R., Oettinger,M.A., Neitzel,H., Jeggo,P.A., and Concannon,P. (2001): DNA ligase IV mutations identified in patients exhibiting developmental delay and immunodeficiency. *Mol.Cell*, 8:1175-1185.
- Obe,G., Pfeiffer,P., Savage,J.R., Johannes,C., Goedecke,W., Jeppesen,P., Natarajan,A.T., Martinez-Lopez,W., Folle,G.A., and Drets,M.E. (2002): Chromosomal aberrations: formation, identification and distribution. *Mutat.Res.*, 504:17-36.

6. Literaturverzeichnis

- Olive,P.L. (1998): The role of DNA single- and double-strand breaks in cell killing by ionizing radiation. *Radiat.Res.*, 150:S42-S51
- Olive,P.L. (2004): Detection of DNA damage in individual cells by analysis of histone H2AX phosphorylation. *Methods Cell Biol.*, 75:355-373.
- Pannunzio,N.R., Manthey,G.M., and Bailis,A.M. (2008): RAD59 is required for efficient repair of simultaneous double-strand breaks resulting in translocations in *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Repair (Amst)*, 7:788-800.
- Paques,F. and Haber,J.E. (1999): Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.*, 63:349-404.
- Paques,F. and Haber,J.E. (1999): Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.*, 63:349-404.
- Pastink,A., Eeken,J.C., and Lohman,P.H. (2001): Genomic integrity and the repair of double-strand DNA breaks. *Mutat.Res.*, 480-481:37-50.
- Pellegata,N.S., Antoniono,R.J., Redpath,J.L., and Stanbridge,E.J. (1996): DNA damage and p53-mediated cell cycle arrest: a reevaluation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 93:15209-15214.
- Perrault,R., Wang,H., Wang,M., Rosidi,B., and Iliakis,G. (2004): Backup pathways of NHEJ are suppressed by DNA-PK. *J.Cell Biochem.*, 92:781-794.
- Perry,J.J., Yannone,S.M., Holden,L.G., Hitomi,C., Asaithamby,A., Han,S., Cooper,P.K., Chen,D.J., and Tainer,J.A. (2006): WRN exonuclease structure and molecular mechanism imply an editing role in DNA end processing. *Nat.Struct.Mol.Biol.*, 13:414-422.
- Peter Karlson, Detlef Doenecke, Jan Koolman, and Georg Fuchs (2005): Karlson Biochemie und Pathobiochemie. *Thieme Verlag, Stuttgart*.
- Petrini,J.H. and Stracker,T.H. (2003): The cellular response to DNA double-strand breaks: defining the sensors and mediators. *Trends Cell Biol.*, 13:458-462.
- Petukhova,G., Stratton,S., and Sung,P. (1998): Catalysis of homologous DNA pairing by yeast Rad51 and Rad54 proteins. *Nature*, 393:91-94.
- Pichierri,P., Franchitto,A., Piergentili,R., Colussi,C., and Palitti,F. (2001): Hypersensitivity to camptothecin in MSH2 deficient cells is correlated with a role for MSH2 protein in recombinational repair. *Carcinogenesis*, 22:1781-1787.
- Pierce,A.J., Hu,P., Han,M., Ellis,N., and Jasin,M. (2001): Ku DNA end-binding protein modulates homologous repair of double-strand breaks in mammalian cells. *Genes Dev.*, 15:3237-3242.
- Pilch,D.R., Sedelnikova,O.A., Redon,C., Celeste,A., Nussenzweig,A., and Bonner,W.M. (2003): Characteristics of gamma-H2AX foci at DNA double-strand breaks sites. *Biochem.Cell Biol.*, 81:123-129.

6. Literaturverzeichnis

- Pittman,D.L., Weinberg,L.R., and Schimenti,J.C. (1998): Identification, characterization, and genetic mapping of Rad51d, a new mouse and human RAD51/RecA-related gene. *Genomics*, 49:103-111.
- Pommier,Y., Redon,C., Rao,V.A., Seiler,J.A., Sordet,O., Takemura,H., Antony,S., Meng,L., Liao,Z., Kohlhagen,G., Zhang,H., and Kohn,K.W. (2003): Repair of and checkpoint response to topoisomerase I-mediated DNA damage. *Mutat.Res.*, 532:173-203.
- Prasad,R., Beard,W.A., Strauss,P.R., and Wilson,S.H. (1998): Human DNA polymerase beta deoxyribose phosphate lyase. Substrate specificity and catalytic mechanism. *J.Biol.Chem.*, 273:15263-15270.
- Puchta,H. (2005): The repair of double-strand breaks in plants: mechanisms and consequences for genome evolution. *J.Exp.Bot.*, 56:1-14.
- Ramsden,D.A. and Gellert,M. (1998): Ku protein stimulates DNA end joining by mammalian DNA ligases: a direct role for Ku in repair of DNA double-strand breaks. *EMBO J.*, 17:609-614.
- Rand,T.A., Petersen,S., Du,F., and Wang,X. (2005): Argonaute2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation. *Cell*, 123:621-629.
- Rattner,J.B., Rao,A., Fritzler,M.J., Valencia,D.W., and Yen,T.J. (1993): CENP-F is a .ca 400 kDa kinetochore protein that exhibits a cell-cycle dependent localization. *Cell Motil.Cytoskeleton*, 26:214-226.
- Reardon,J.T., Mu,D., and Sancar,A. (1996): Overproduction, purification, and characterization of the XPC subunit of the human DNA repair excision nuclease. *J.Biol.Chem.*, 271:19451-19456.
- Reddy,Y.V., Ding,Q., Lees-Miller,S.P., Meek,K., and Ramsden,D.A. (2004): Non-homologous end joining requires that the DNA-PK complex undergo an autophosphorylation-dependent rearrangement at DNA ends. *J.Biol.Chem.*, 279:39408-39413.
- Reddy,Y.V., Ding,Q., Lees-Miller,S.P., Meek,K., and Ramsden,D.A. (2004): Non-homologous end joining requires that the DNA-PK complex undergo an autophosphorylation-dependent rearrangement at DNA ends. *J.Biol.Chem.*, 279:39408-39413.
- Redon,C., Pilch,D., Rogakou,E., Sedelnikova,O., Newrock,K., and Bonner,W. (2002): Histone H2A variants H2AX and H2AZ. *Curr.Opin.Genet.Dev.*, 12:162-169.
- Reeves,W.H. and Sthoeger,Z.M. (1989): Molecular cloning of cDNA encoding the p70 (Ku) lupus autoantigen. *J.Biol.Chem.*, 264:5047-5052.
- Reliene,R., Bishop,A.J., Li,G., and Schiestl,R.H. (2004): Ku86 deficiency leads to reduced intrachromosomal homologous recombination in vivo in mice. *DNA Repair (Amst)*, 3:103-111.
- Riballo,E., Critchlow,S.E., Teo,S.H., Doherty,A.J., Priestley,A., Broughton,B., Kysela,B., Beamish,H., Plowman,N., Arlett,C.F., Lehmann,A.R., Jackson,S.P., and Jeggo,P.A.

6. Literaturverzeichnis

- (1999): Identification of a defect in DNA ligase IV in a radiosensitive leukaemia patient. *Curr.Biol.*, 9:699-702.
- Riballo,E., Doherty,A.J., Dai,Y., Stiff,T., Oettinger,M.A., Jeggo,P.A., and Kysela,B. (2001): Cellular and biochemical impact of a mutation in DNA ligase IV conferring clinical radiosensitivity. *J.Biol.Chem.*, 276:31124-31132.
- Riballo,E., Kuhne,M., Rief,N., Doherty,A., Smith,G.C., Recio,M.J., Reis,C., Dahm,K., Fricke,A., Krempler,A., Parker,A.R., Jackson,S.P., Gennery,A., Jeggo,P.A., and Lobrich,M. (2004): A pathway of double-strand break rejoining dependent upon ATM, Artemis, and proteins locating to gamma-H2AX foci. *Mol.Cell*, 16:715-724.
- Richardson,C., Moynahan,M.E., and Jasin,M. (1998): Double-strand break repair by interchromosomal recombination: suppression of chromosomal translocations. *Genes Dev.*, 12:3831-3842.
- Richardson,C. and Jasin,M. (2000): Frequent chromosomal translocations induced by DNA double-strand breaks. *Nature*, 405:697-700.
- Richardson,C. and Jasin,M. (2000): Frequent chromosomal translocations induced by DNA double-strand breaks. *Nature*, 405:697-700.
- Rijkers,T., Van Den,O.J., Morolli,B., Rolink,A.G., Baarends,W.M., Van Sloun,P.P., Lohman,P.H., and Pastink,A. (1998): Targeted inactivation of mouse RAD52 reduces homologous recombination but not resistance to ionizing radiation. *Mol.Cell Biol.*, 18:6423-6429.
- Riley,W.W., Jr. and Eales,J.G. (1994): Characterization of 3,5,3'-triiodo-L-thyronine transport into hepatocytes isolated from juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), and comparison with L-thyroxine transport. *Gen.Comp Endocrinol.*, 95:301-309.
- Ristic,D., Wyman,C., Paulusma,C., and Kanaar,R. (2001): The architecture of the human Rad54-DNA complex provides evidence for protein translocation along DNA. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 98:8454-8460.
- Roca,A.I. and Cox,M.M. (1997): RecA protein: structure, function, and role in recombinational DNA repair. *Prog.Nucleic Acid Res.Mol.Biol.*, 56:129-223.
- Rogakou,E.P., Pilch,D.R., Orr,A.H., Ivanova,V.S., and Bonner,W.M. (1998): DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J.Biol.Chem.*, 273:5858-5868.
- Rogakou,E.P., Boon,C., Redon,C., and Bonner,W.M. (1999): Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *J.Cell Biol.*, 146:905-916.
- Rolink,A., Melchers,F., and Andersson,J. (1996): The SCID but not the RAG-2 gene product is required for S mu-S epsilon heavy chain class switching. *Immunity.*, 5:319-330.
- Rosidi,B., Wang,M., Wu,W., Sharma,A., Wang,H., and Iliakis,G. (2008): Histone H1 functions as a stimulatory factor in backup pathways of NHEJ. *Nucleic Acids Res.*, 36:1610-1623.

6. Literaturverzeichnis

- Rothkamm,K. and Lobrich,M. (2003): Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 100:5057-5062.
- Rube,C.E., Grudzenski,S., Kuhne,M., Dong,X., Rief,N., Lobrich,M., and Rube,C. (2008): DNA double-strand break repair of blood lymphocytes and normal tissues analysed in a preclinical mouse model: implications for radiosensitivity testing. *Clin.Cancer Res.*, 14:6546-6555.
- Rubio,M.A., Kim,S.H., and Campisi,J. (2002): Reversible manipulation of telomerase expression and telomere length. Implications for the ionizing radiation response and replicative senescence of human cells. *J.Biol.Chem.*, 277:28609-28617.
- Saberi,A., Hochegger,H., Szuts,D., Lan,L., Yasui,A., Sale,J.E., Taniguchi,Y., Murakawa,Y., Zeng,W., Yokomori,K., Helleday,T., Teraoka,H., Arakawa,H., Buerstedde,J.M., and Takeda,S. (2007): RAD18 and poly(ADP-ribose) polymerase independently suppress the access of nonhomologous end joining to double-strand breaks and facilitate homologous recombination-mediated repair. *Mol.Cell Biol.*, 27:2562-2571.
- Saintigny,Y., Delacote,F., Vares,G., Petitot,F., Lambert,S., Aeverbeck,D., and Lopez,B.S. (2001): Characterization of homologous recombination induced by replication inhibition in mammalian cells. *EMBO J.*, 20:3861-3870.
- Sakamoto,S., Iijima,K., Mochizuki,D., Nakamura,K., Teshigawara,K., Kobayashi,J., Matsuura,S., Tauchi,H., and Komatsu,K. (2007): Homologous recombination repair is regulated by domains at the N- and C-terminus of NBS1 and is dissociated with ATM functions. *Oncogene*, 26:6002-6009.
- Saleh-Gohari,N., Bryant,H.E., Schultz,N., Parker,K.M., Cassel,T.N., and Helleday,T. (2005): Spontaneous homologous recombination is induced by collapsed replication forks that are caused by endogenous DNA single-strand breaks. *Mol.Cell Biol.*, 25:7158-7169.
- Saleh,E.M. and El Awady,R.A. (2005): Misrejoined , residual double strand DNA breaks and radiosensitivity in human tumor cell lines. *J.Egypt.Natl.Canc.Inst.*, 17:93-102.
- Sancar,A. (1996): DNA excision repair. *Annu.Rev.Biochem.*, 65:43-81.
- Sancar,A., Lindsey-Boltz,L.A., Unsal-Kacmaz,K., and Linn,S. (2004): Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu.Rev.Biochem.*, 73:39-85.
- Sargent,R.G., Brenneman,M.A., and Wilson,J.H. (1997): Repair of site-specific double-strand breaks in a mammalian chromosome by homologous and illegitimate recombination. *Mol.Cell Biol.*, 17:267-277.
- Sarkaria,J.N., Busby,E.C., Tibbetts,R.S., Roos,P., Taya,Y., Karnitz,L.M., and Abraham,R.T. (1999): Inhibition of ATM and ATR kinase activities by the radiosensitizing agent, caffeine. *Cancer Res.*, 59:4375-4382.
- Sartori,A.A., Lukas,C., Coates,J., Mistrik,M., Fu,S., Bartek,J., Baer,R., Lukas,J., and Jackson,S.P. (2007): Human CtIP promotes DNA end resection. *Nature*, 450:509-514.

6. Literaturverzeichnis

- Schrader,C.E., Linehan,E.K., Mochegova,S.N., Woodland,R.T., and Stavnezer,J. (2005): Inducible DNA breaks in Ig S regions are dependent on AID and UNG. *J.Exp.Med.*, 202:561-568.
- Schwartz,J.L., Mustafi,R., Beckett,M.A., and Weichselbaum,R.R. (1996): DNA double-strand break rejoining rates, inherent radiation sensitivity and human tumour response to radiotherapy. *Br.J.Cancer*, 74:37-42.
- Schwartz,M., Zlotorynski,E., Goldberg,M., Ozeri,E., Rahat,A., le Sage,C., Chen,B.P., Chen,D.J., Agami,R., and Kerem,B. (2005): Homologous recombination and nonhomologous end-joining repair pathways regulate fragile site stability. *Genes Dev.*, 19:2715-2726.
- Scully,R. and Xie,A. (2005): In my end is my beginning: control of end resection and DSBR pathway 'choice' by cyclin-dependent kinases. *Oncogene*, 24:2871-2876.
- Sedelnikova,O.A., Rogakou,E.P., Panyutin,I.G., and Bonner,W.M. (2002): Quantitative detection of (125)IdU-induced DNA double-strand breaks with gamma-H2AX antibody. *Radiat.Res.*, 158:486-492.
- Shafman,T., Khanna,K.K., Kedar,P., Spring,K., Kozlov,S., Yen,T., Hobson,K., Gatei,M., Zhang,N., Watters,D., Egerton,M., Shiloh,Y., Kharbanda,S., Kufe,D., and Lavin,M.F. (1997): Interaction between ATM protein and c-Abl in response to DNA damage. *Nature*, 387:520-523.
- Shalev,G. and Levy,A.A. (1997): The maize transposable element Ac induces recombination between the donor site and an homologous ectopic sequence. *Genetics*, 146:1143-1151.
- Sharan,S.K., Morimatsu,M., Albrecht,U., Lim,D.S., Regel,E., Dinh,C., Sands,A., Eichele,G., Hasty,P., and Bradley,A. (1997): Embryonic lethality and radiation hypersensitivity mediated by Rad51 in mice lacking Brca2. *Nature*, 386:804-810.
- Shiloh,Y. (2003): ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat.Rev.Cancer*, 3:155-168.
- Shim,K.S., Schmutte,C., Tomblin,G., Heinen,C.D., and Fishel,R. (2004): hXRCC2 enhances ADP/ATP processing and strand exchange by hRAD51. *J.Biol.Chem.*, 279:30385-30394.
- Shinohara,A., Shinohara,M., Ohta,T., Matsuda,S., and Ogawa,T. (1998): Rad52 forms ring structures and co-operates with RPA in single-strand DNA annealing. *Genes Cells*, 3:145-156.
- Shrivastav,M., De Haro,L.P., and Nickoloff,J.A. (2008): Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. *Cell Res.*, 18:134-147.
- Singh,N.P., McCoy,M.T., Tice,R.R., and Schneider,E.L. (1988): A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp.Cell Res.*, 175:184-191.
- Singh,N.P. and Stephens,R.E. (1997): Microgel electrophoresis: sensitivity, mechanisms, and DNA electrostretching. *Mutat.Res.*, 383:167-175.

6. Literaturverzeichnis

- Sipley,J.D., Menninger,J.C., Hartley,K.O., Ward,D.C., Jackson,S.P., and Anderson,C.W. (1995): Gene for the catalytic subunit of the human DNA-activated protein kinase maps to the site of the XRCC7 gene on chromosome 8. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 92:7515-7519.
- Smith,G.C. and Jackson,S.P. (1999): The DNA-dependent protein kinase. *Genes Dev.*, 13:916-934.
- Smith,G.C., Divecha,N., Lakin,N.D., and Jackson,S.P. (1999): DNA-dependent protein kinase and related proteins. *Biochem.Soc.Symp.*, 64:91-104.
- Sobhian,B., Shao,G., Lilli,D.R., Culhane,A.C., Moreau,L.A., Xia,B., Livingston,D.M., and Greenberg,R.A. (2007): RAP80 targets BRCA1 to specific ubiquitin structures at DNA damage sites. *Science*, 316:1198-1202.
- Solinger,J.A., Lutz,G., Sugiyama,T., Kowalczykowski,S.C., and Heyer,W.D. (2001): Rad54 protein stimulates heteroduplex DNA formation in the synaptic phase of DNA strand exchange via specific interactions with the presynaptic Rad51 nucleoprotein filament. *J.Mol.Biol.*, 307:1207-1221.
- Solinger,J.A., Kiiianitsa,K., and Heyer,W.D. (2002): Rad54, a Swi2/Snf2-like recombinational repair protein, disassembles Rad51:dsDNA filaments. *Mol.Cell*, 10:1175-1188.
- Sonoda,E., Sasaki,M.S., Buerstedde,J.M., Bezzubova,O., Shinohara,A., Ogawa,H., Takata,M., Yamaguchi-Iwai,Y., and Takeda,S. (1998): Rad51-deficient vertebrate cells accumulate chromosomal breaks prior to cell death. *EMBO J.*, 17:598-608.
- Sonoda,E., Sasaki,M.S., Morrison,C., Yamaguchi-Iwai,Y., Takata,M., and Takeda,S. (1999): Sister chromatid exchanges are mediated by homologous recombination in vertebrate cells. *Mol.Cell Biol.*, 19:5166-5169.
- Sonoda,E., Morrison,C., Yamashita,Y.M., Takata,M., and Takeda,S. (2001): Reverse genetic studies of homologous DNA recombination using the chicken B-lymphocyte line, DT40. *Philos.Trans.R.Soc.Lond B Biol.Sci.*, 356:111-117.
- Sonoda,E., Hohegger,H., Saberi,A., Taniguchi,Y., and Takeda,S. (2006): Differential usage of non-homologous end-joining and homologous recombination in double strand break repair. *DNA Repair (Amst)*, 5:1021-1029.
- Sorensen,C.S., Hansen,L.T., Dziegielewski,J., Syljuasen,R.G., Lundin,C., Bartek,J., and Helleday,T. (2005): The cell-cycle checkpoint kinase Chk1 is required for mammalian homologous recombination repair. *Nat.Cell Biol.*, 7:195-201.
- Stewart,G.S., Wang,B., Bignell,C.R., Taylor,A.M., and Elledge,S.J. (2003): MDC1 is a mediator of the mammalian DNA damage checkpoint. *Nature*, 421:961-966.
- Stiff,T., O'Driscoll,M., Rief,N., Iwabuchi,K., Lobrich,M., and Jeggo,P.A. (2004): ATM and DNA-PK function redundantly to phosphorylate H2AX after exposure to ionizing radiation. *Cancer Res.*, 64:2390-2396.
- Stucki,M., Clapperton,J.A., Mohammad,D., Yaffe,M.B., Smerdon,S.J., and Jackson,S.P. (2005): MDC1 directly binds phosphorylated histone H2AX to regulate cellular responses to DNA double-strand breaks. *Cell*, 123:1213-1226.

6. Literaturverzeichnis

- Stucki,M. and Jackson,S.P. (2006): gammaH2AX and MDC1: anchoring the DNA-damage-response machinery to broken chromosomes. *DNA Repair (Amst)*, 5:534-543.
- Sugawara,N. and Haber,J.E. (1992): Characterization of double-strand break-induced recombination: homology requirements and single-stranded DNA formation. *Mol.Cell Biol.*, 12:563-575.
- Sugawara,N., Paques,F., Colaiacovo,M., and Haber,J.E. (1997): Role of *Saccharomyces cerevisiae* Msh2 and Msh3 repair proteins in double-strand break-induced recombination. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 94:9214-9219.
- Sugawara,N., Ira,G., and Haber,J.E. (2000): DNA length dependence of the single-strand annealing pathway and the role of *Saccharomyces cerevisiae* RAD59 in double-strand break repair. *Mol.Cell Biol.*, 20:5300-5309.
- Sugiyama,T., Zaitseva,E.M., and Kowalczykowski,S.C. (1997): A single-stranded DNA-binding protein is needed for efficient presynaptic complex formation by the *Saccharomyces cerevisiae* Rad51 protein. *J.Biol.Chem.*, 272:7940-7945.
- Sung,P., Krejci,L., van Komen,S., and Sehorn,M.G. (2003): Rad51 recombinase and recombination mediators. *J.Biol.Chem.*, 278:42729-42732.
- Sutherland,B.M., Bennett,P.V., Sidorkina,O., and Laval,J. (2000): Clustered damages and total lesions induced in DNA by ionizing radiation: oxidized bases and strand breaks. *Biochemistry*, 39:8026-8031.
- Sutherland,B.M., Bennett,P.V., Sidorkina,O., and Laval,J. (2000): Clustered DNA damages induced in isolated DNA and in human cells by low doses of ionizing radiation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 97:103-108.
- Sutherland,B.M., Bennett,P.V., Sidorkina,O., and Laval,J. (2000): Clustered damages and total lesions induced in DNA by ionizing radiation: oxidized bases and strand breaks. *Biochemistry*, 39:8026-8031.
- Sutherland,B.M., Bennett,P.V., Sidorkina,O., and Laval,J. (2000): Clustered DNA damages induced in isolated DNA and in human cells by low doses of ionizing radiation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 97:103-108.
- Szostak,J.W., Orr-Weaver,T.L., Rothstein,R.J., and Stahl,F.W. (1983): The double-strand-break repair model for recombination. *Cell*, 33:25-35.
- Taccioli,G.E., Rathbun,G., Oltz,E., Stamato,T., Jeggo,P.A., and Alt,F.W. (1993): Impairment of V(D)J recombination in double-strand break repair mutants. *Science*, 260:207-210.
- Taccioli,G.E., Amatucci,A.G., Beamish,H.J., Gell,D., Xiang,X.H., Torres Arzayus,M.I., Priestley,A., Jackson,S.P., Marshak,R.A., Jeggo,P.A., and Herrera,V.L. (1998): Targeted disruption of the catalytic subunit of the DNA-PK gene in mice confers severe combined immunodeficiency and radiosensitivity. *Immunity*, 9:355-366.
- Takashima,Y., Sakuraba,M., Koizumi,T., Sakamoto,H., Hayashi,M., and Honma,M. (2009): Dependence of DNA double strand break repair pathways on cell cycle phase in human lymphoblastoid cells. *Environ.Mol.Mutagen.*, 50:815-822.

6. Literaturverzeichnis

- Takata,M., Sasaki,M.S., Sonoda,E., Morrison,C., Hashimoto,M., Utsumi,H., Yamaguchi-Iwai,Y., Shinohara,A., and Takeda,S. (1998): Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells. *EMBO J.*, 17:5497-5508.
- Takata,M., Sasaki,M.S., Tachiiri,S., Fukushima,T., Sonoda,E., Schild,D., Thompson,L.H., and Takeda,S. (2001): Chromosome instability and defective recombinational repair in knockout mutants of the five Rad51 paralogs. *Mol.Cell Biol.*, 21:2858-2866.
- Tambini,C.E., George,A.M., Rommens,J.M., Tsui,L.C., Scherer,S.W., and Thacker,J. (1997): The XRCC2 DNA repair gene: identification of a positional candidate. *Genomics*, 41:84-92.
- Tan,T.L., Essers,J., Citterio,E., Swagemakers,S.M., de Wit,J., Benson,F.E., Hoeijmakers,J.H., and Kanaar,R. (1999): Mouse Rad54 affects DNA conformation and DNA-damage-induced Rad51 foci formation. *Curr.Biol.*, 9:325-328.
- Tan,T.L., Kanaar,R., and Wyman,C. (2003): Rad54, a Jack of all trades in homologous recombination. *DNA Repair (Amst)*, 2:787-794.
- Taneja,N., Davis,M., Choy,J.S., Beckett,M.A., Singh,R., Kron,S.J., and Weichselbaum,R.R. (2004): Histone H2AX phosphorylation as a predictor of radiosensitivity and target for radiotherapy. *J.Biol.Chem.*, 279:2273-2280.
- Tebbs,R.S., Zhao,Y., Tucker,J.D., Scheerer,J.B., Siciliano,M.J., Hwang,M., Liu,N., Legerski,R.J., and Thompson,L.H. (1995): Correction of chromosomal instability and sensitivity to diverse mutagens by a cloned cDNA of the XRCC3 DNA repair gene. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 92:6354-6358.
- Tibbetts,R.S., Cortez,D., Brumbaugh,K.M., Scully,R., Livingston,D., Elledge,S.J., and Abraham,R.T. (2000): Functional interactions between BRCA1 and the checkpoint kinase ATR during genotoxic stress. *Genes Dev.*, 14:2989-3002.
- Todaro,G.J. and Green,H. (1963): Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *J.Cell Biol.*, 17:299-313.
- Tomari,Y. and Zamore,P.D. (2005): Perspective: machines for RNAi. *Genes Dev.*, 19:517-529.
- Tutt,A., Bertwistle,D., Valentine,J., Gabriel,A., Swift,S., Ross,G., Griffin,C., Thacker,J., and Ashworth,A. (2001): Mutation in Brca2 stimulates error-prone homology-directed repair of DNA double-strand breaks occurring between repeated sequences. *EMBO J.*, 20:4704-4716.
- Van Dyck,E., Hajibagheri,N.M., Stasiak,A., and West,S.C. (1998): Visualisation of human rad52 protein and its complexes with hRad51 and DNA. *J.Mol.Biol.*, 284:1027-1038.
- Van Dyck,E., Stasiak,A.Z., Stasiak,A., and West,S.C. (1999): Binding of double-strand breaks in DNA by human Rad52 protein. *Nature*, 398:728-731.
- van Gent,D.C., Hoeijmakers,J.H., and Kanaar,R. (2001): Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection. *Nat.Rev.Genet.*, 2:196-206.

6. Literaturverzeichnis

- Vasquez,K.M., Marburger,K., Intody,Z., and Wilson,J.H. (2001): Manipulating the mammalian genome by homologous recombination. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 98:8403-8410.
- Venkitaraman,A.R. (2002): Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2. *Cell*, 108:171-182.
- Volker,M., Mone,M.J., Karmakar,P., van Hoffen,A., Schul,W., Vermeulen,W., Hoeijmakers,J.H., van Driel,R., van Zeeland,A.A., and Mullenders,L.H. (2001): Sequential assembly of the nucleotide excision repair factors in vivo. *Mol.Cell*, 8:213-224.
- Wachsberger,P.R., Li,W.H., Guo,M., Chen,D., Cheong,N., Ling,C.C., Li,G., and Iliakis,G. (1999): Rejoining of DNA double-strand breaks in Ku80-deficient mouse fibroblasts. *Radiat.Res.*, 151:398-407.
- Wang,B., Matsuoka,S., Carpenter,P.B., and Elledge,S.J. (2002): 53BP1, a mediator of the DNA damage checkpoint. *Science*, 298:1435-1438.
- Wang,B. and Elledge,S.J. (2007): Ubc13/Rnf8 ubiquitin ligases control foci formation of the Rap80/Abraxas/Brcal/Brcc36 complex in response to DNA damage. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 104:20759-20763.
- Wang,H., Guan,J., Wang,H., Perrault,A.R., Wang,Y., and Iliakis,G. (2001): Replication protein A2 phosphorylation after DNA damage by the coordinated action of ataxia telangiectasia-mutated and DNA-dependent protein kinase. *Cancer Res.*, 61:8554-8563.
- Wang,H., Zeng,Z.C., Bui,T.A., Sonoda,E., Takata,M., Takeda,S., and Iliakis,G. (2001): Efficient rejoining of radiation-induced DNA double-strand breaks in vertebrate cells deficient in genes of the RAD52 epistasis group. *Oncogene*, 20:2212-2224.
- Wang,H., Perrault,A.R., Takeda,Y., Qin,W., Wang,H., and Iliakis,G. (2003): Biochemical evidence for Ku-independent backup pathways of NHEJ. *Nucleic Acids Res.*, 31:5377-5388.
- Wang,H., Rosidi,B., Perrault,R., Wang,M., Zhang,L., Windhofer,F., and Iliakis,G. (2005): DNA ligase III as a candidate component of backup pathways of nonhomologous end joining. *Cancer Res.*, 65:4020-4030.
- Wang,J., Pluth,J.M., Cooper,P.K., Cowan,M.J., Chen,D.J., and Yannone,S.M. (2005): Artemis deficiency confers a DNA double-strand break repair defect and Artemis phosphorylation status is altered by DNA damage and cell cycle progression. *DNA Repair (Amst)*, 4:556-570.
- Wang,M., Wu,W., Wu,W., Rosidi,B., Zhang,L., Wang,H., and Iliakis,G. (2006): PARP-1 and Ku compete for repair of DNA double strand breaks by distinct NHEJ pathways. *Nucleic Acids Res.*, 34:6170-6182.
- Wang,X. and D'Andrea,A.D. (2004): The interplay of Fanconi anemia proteins in the DNA damage response. *DNA Repair (Amst)*, 3:1063-1069.

6. Literaturverzeichnis

- Wang,Y., Cortez,D., Yazdi,P., Neff,N., Elledge,S.J., and Qin,J. (2000): BASC, a super complex of BRCA1-associated proteins involved in the recognition and repair of aberrant DNA structures. *Genes Dev.*, 14:927-939.
- Ward,I.M., Reina-San-Martin,B., Oлару,A., Minn,K., Tamada,K., Lau,J.S., Cascalho,M., Chen,L., Nussenzweig,A., Livak,F., Nussenzweig,M.C., and Chen,J. (2004): 53BP1 is required for class switch recombination. *J.Cell Biol.*, 165:459-464.
- Ward,J.F. (1988): DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation, and reparability. *Prog.Nucleic Acid Res.Mol.Biol.*, 35:95-125.
- Waterman,M.J., Stavridi,E.S., Waterman,J.L., and Halazonetis,T.D. (1998): ATM-dependent activation of p53 involves dephosphorylation and association with 14-3-3 proteins. *Nat.Genet.*, 19:175-178.
- Werner Stolz (2005): *Radioaktivität*.
- West,S.C. (2003): Molecular views of recombination proteins and their control. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.*, 4:435-445.
- Weterings,E., Verkaik,N.S., Bruggenwirth,H.T., Hoeijmakers,J.H., and van Gent,D.C. (2003): The role of DNA dependent protein kinase in synapsis of DNA ends. *Nucleic Acids Res.*, 31:7238-7246.
- Whitaker,S.J., Powell,S.N., and McMillan,T.J. (1991): Molecular assays of radiation-induced DNA damage. *Eur.J.Cancer*, 27:922-928.
- White,C.I. and Haber,J.E. (1990): Intermediates of recombination during mating type switching in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.*, 9:663-673.
- Williams,G.H. and Stoeber,K. (2007): Cell cycle markers in clinical oncology. *Curr.Opin.Cell Biol.*, 19:672-679.
- Wojewodzka,M., Buraczewska,I., and Kruszewski,M. (2002): A modified neutral comet assay: elimination of lysis at high temperature and validation of the assay with anti-single-stranded DNA antibody. *Mutat.Res.*, 518:9-20.
- Wolner,B., van Komen,S., Sung,P., and Peterson,C.L. (2003): Recruitment of the recombinational repair machinery to a DNA double-strand break in yeast. *Mol.Cell*, 12:221-232.
- Wong,A.K., Pero,R., Ormonde,P.A., Tavtigian,S.V., and Bartel,P.L. (1997): RAD51 interacts with the evolutionarily conserved BRC motifs in the human breast cancer susceptibility gene *brca2*. *J.Biol.Chem.*, 272:31941-31944.
- Wood,R.D., Mitchell,M., Sgouros,J., and Lindahl,T. (2001): Human DNA repair genes. *Science*, 291:1284-1289.
- Wu,J., Huen,M.S., Lu,L.Y., Ye,L., Dou,Y., Ljungman,M., Chen,J., and Yu,X. (2009): Histone ubiquitination associates with BRCA1-dependent DNA damage response. *Mol.Cell Biol.*, 29:849-860.

6. Literaturverzeichnis

- Wu,W., Wang,M., Mussfeldt,T., and Iliakis,G. (2008): Enhanced use of backup pathways of NHEJ in G2 in Chinese hamster mutant cells with defects in the classical pathway of NHEJ. *Radiat.Res.*, 170:512-520.
- Xie,A., Hartlerode,A., Stucki,M., Odate,S., Puget,N., Kwok,A., Nagaraju,G., Yan,C., Alt,F.W., Chen,J., Jackson,S.P., and Scully,R. (2007): Distinct roles of chromatin-associated proteins MDC1 and 53BP1 in mammalian double-strand break repair. *Mol.Cell*, 28:1045-1057.
- Xie,A., Hartlerode,A., Stucki,M., Odate,S., Puget,N., Kwok,A., Nagaraju,G., Yan,C., Alt,F.W., Chen,J., Jackson,S.P., and Scully,R. (2007): Distinct roles of chromatin-associated proteins MDC1 and 53BP1 in mammalian double-strand break repair. *Mol.Cell*, 28:1045-1057.
- Xu,Y. and Baltimore,D. (1996): Dual roles of ATM in the cellular response to radiation and in cell growth control. *Genes Dev.*, 10:2401-2410.
- Xu,Y. (2006): DNA damage: a trigger of innate immunity but a requirement for adaptive immune homeostasis. *Nat.Rev.Immunol.*, 6:261-270.
- Yamaguchi-Iwai,Y., Sonoda,E., Buerstedde,J.M., Bezzubova,O., Morrison,C., Takata,M., Shinohara,A., and Takeda,S. (1998): Homologous recombination, but not DNA repair, is reduced in vertebrate cells deficient in RAD52. *Mol.Cell Biol.*, 18:6430-6435.
- Yan,J., Kim,Y.S., Yang,X.P., Li,L.P., Liao,G., Xia,F., and Jetten,A.M. (2007): The ubiquitin-interacting motif containing protein RAP80 interacts with BRCA1 and functions in DNA damage repair response. *Cancer Res.*, 67:6647-6656.
- Yano,K., Morotomi-Yano,K., Adachi,N., and Akiyama,H. (2009): Molecular mechanism of protein assembly on DNA double-strand breaks in the non-homologous end-joining pathway. *J.Radiat.Res.(Tokyo)*, 50:97-108.
- Yoo,E., Kim,B.U., Lee,S.Y., Cho,C.H., Chung,J.H., and Lee,C.H. (2005): 53BP1 is associated with replication protein A and is required for RPA2 hyperphosphorylation following DNA damage. *Oncogene*, 24:5423-5430.
- Yuan,Y.R., Pei,Y., Chen,H.Y., Tuschl,T., and Patel,D.J. (2006): A potential protein-RNA recognition event along the RISC-loading pathway from the structure of A. aeolicus Argonaute with externally bound siRNA. *Structure.*, 14:1557-1565.
- Zhang,J., Ma,Z., Treszezamsky,A., and Powell,S.N. (2005): MDC1 interacts with Rad51 and facilitates homologous recombination. *Nat.Struct.Mol.Biol.*, 12:902-909.
- Zhang,X., Succi,J., Feng,Z., Prithivirajsingh,S., Story,M.D., and Legerski,R.J. (2004): Artemis is a phosphorylation target of ATM and ATR and is involved in the G2/M DNA damage checkpoint response. *Mol.Cell Biol.*, 24:9207-9220.
- Zhao,G.Y., Sonoda,E., Barber,L.J., Oka,H., Murakawa,Y., Yamada,K., Ikura,T., Wang,X., Kobayashi,M., Yamamoto,K., Boulton,S.J., and Takeda,S. (2007): A critical role for the ubiquitin-conjugating enzyme Ubc13 in initiating homologous recombination. *Mol.Cell*, 25:663-675.

6. Literaturverzeichnis

- Zhong,Q., Chen,C.F., Li,S., Chen,Y., Wang,C.C., Xiao,J., Chen,P.L., Sharp,Z.D., and Lee,W.H. (1999): Association of BRCA1 with the hRad50-hMre11-p95 complex and the DNA damage response. *Science*, 285:747-750.
- ZIRKLE,R.E. and TOBIAS,C.A. (1953): Effects of ploidy and linear energy transfer on radiobiological survival curves. *Arch.Biochem.Biophys.*, 47:282-306.
- Ziv,Y., Bielopolski,D., Galanty,Y., Lukas,C., Taya,Y., Schultz,D.C., Lukas,J., Bekker-Jensen,S., Bartek,J., and Shiloh,Y. (2006): Chromatin relaxation in response to DNA double-strand breaks is modulated by a novel ATM- and KAP-1 dependent pathway. *Nat.Cell Biol.*, 8:870-876.

7. Anhang

7.1. Lebenslauf

Personalien

Name: Leopoldine Njoke A Biaka, geb. Tchouandong-Nono
Geburtsdatum: 22 Januar 1977
Geburtsland: Doula (Kamerun)
Familienstatus: Verheiratet, ein Kind

Bildungsweg

1987 – 1995: Besuch des Gymnasiums in Douala (Kamerun)
Abschluss: Baccalauréat (französisches Abitur)
1996 – 1996: Deutschkurs an der Universität Heidelberg
Abschluss: PNDS (Prüfung zum Nachweis Deutsche Sprachkenntnisse)
1996 – 1998: Studium der Chemie an der Universität Heidelberg
1998 – 2003: Quereinstieg zum Studium der Biologie an der Universität Heidelberg
Abschluss: Diplom Biologin
2004 – 2008: Promotionsstipendiatin am Universitätsklinikum des Saarlandes und Fortsetzung der Promotion an der Technischen Universität Darmstadt unter der Anleitung von Prof. Markus Löbrich

Berufliche Tätigkeiten

2001 – 2001: Praktikantin bei der Firma Merck in Darmstadt
2003 – 2004: Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Entwicklungsneurobiologie der Universität Heidelberg, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Pollerberg
2008 – 2008: Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Zoologie, Abteilung Strahlenbiologie und DNA-Reparatur der Technischen Universität Darmstadt, Arbeitsgruppe Prof. Markus Löbrich

7.2. Publikationen und Tagungsbeiträge

Publikationen

Beucher, A., J. Birraux, L. Tchouandong, O. Barton, A. Shibata, S. Conrad, A. A. Goodarzi, A. Krempler, P. A. Jeggo, and M. Lobrich. 2009. ATM and Artemis promote homologous recombination of radiation-induced DNA double-strand breaks in G2. *EMBO J.* **28**:3413-3427.

Deckbar, D., J. Birraux, A. Krempler, L. Tchouandong, A. Beucher, S. Walker, T. Stiff, P. Jeggo, and M. Lobrich. 2007. Chromosome breakage after G2 checkpoint release. *J. Cell Biol.* **176**:749-755.

Tagungsbeiträge

Beucher A, Tchouandong L, Krempler A, and Löbrich M (2006) „ATM and Artemis and their role in homologous recombination in G2“. Vortrag, 9th Biennial Meeting of the DGDR, Hamburg.

Beucher A, Tchouandong L, Krempler A, and Löbrich M (2006) „Komponenten der DNA Doppelstrangbruchreparatur und ihre Bedeutung im ATM-abhängigen DNA-Reparaturweg“. Vortrag, 9. Jahrestagung der GBS, Braunschweig.

Tchouandong L „Der Beitrag des ATM- und Artemis-abhängigen Reparaturwegs zur Doppelstrangbruch Reparatur im Zellzyklus“. Vortrag, Graduiertenkolleg „zelluläre Regulation und Wachstum“ in Homburg (Saar) (2005).

Tchouandong L “Über den Beitrag von Nicht-Homologem Endjoining (NHEJ) und Homologer Rekombination (HR) bei der Reparatur von Doppelstrangbrüchen (DSBs): die Rolle von ATM und Artemis. Vortrag, 10. Jahrestagung der GBS, Mainz.

L Tchouandong, A Beucher, N Rief, O Barton, D Deckbar, A Krempler und M Löbrich „Contribution of non-homologous end-joining (NHEJ) and the homologous recombination (HR) pathways in the repair of DNA double strand breaks (DSBs) in mammalian cells Poster, first german-french meeting in Toulouse (France) (2007).

Tchouandong L “Induktion und Reparatur von DNA Doppelstrangbrüchen” (2007) Kurs: „Schutz des Menschen und der Umwelt vor ionisierender Strahlung“ bei der Wilhelm und Else Heraeus Physilschule in Bad Honnef

7.3. Danksagung

Ich möchte mich bei Prof. Dr. Markus Löbrich für die Annahme als Doktorandin in seiner Arbeitsgruppe, für seine Unterstützung in aller Hinsicht meiner Arbeit, für seine Diskussionsbereitschaft und für die Bewertung meiner Arbeit bedanken.

Prof. Dr. Gerhard Thiel danke ich für seine bereitwillige Funktion als Koreferent.

Prof. Dr. H. U. Göringer und Prof. Dr. Peter Friedl danke ich für Ihre Bereitschaft, meine Arbeit zu prüfen.

Dr. Andrea Kremppler danke ich für die umfangreiche und intensive Betreuung meiner Arbeit und für ihre privaten Tips außerhalb des Labors.

Dr. Andrea Beucher, Dr. Olivia Barton und Dr. Dorothee Deckbar danke ich besonders für ihre Hilfe bei der Korrektur dieser Arbeit.

Prof. Dr. Mathias Montenarh danke ich für seine ehemalige Funktion als Koreferent und für die finanzielle und wissenschaftliche Unterstützung der vorliegenden Arbeit durch das Graduiertenkolleg „zelluläre Regulation und Wachstum“ in Homburg (Saar).

Den gesamten Mitgliedern der Arbeitsgruppe Löbrich danke ich für die Zusammenarbeit bei der Methodenanwendung- und -optimierung und für die gute Arbeitsatmosphäre.

Meinem Mann Alain Njoke und meinem Sohn Lavan Njoke danke ich für ihre liebevolle Unterstützung und für ihre Anwesenheit in meinem Leben.

Vor allem möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, die meine Anreise nach Deutschland erlaubt und mich stets unterstützt hat, als ich deprimierende Momente verbrachte. Ohne Euch hätte ich es nicht geschafft.

7.4. Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit am Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig erfasst und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmitteln verwendet habe.

Darmstadt, den 17 Oktober 2010

(Léopoldine Njoke A Biaka)